



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Ciencias Biológicas

**Evaluación de marcadores intrónicos para estimar la
diversidad genética de la caballa, *Scomber japonicus*,
en el mar peruano**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en
Hidrobiología y Pesquería

AUTOR

Juan Luis VALDEZ BAEZ

ASESOR

Daniel Saul ORÉ CHÁVEZ

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Valdez, J. (2017). *Evaluación de marcadores intrónicos para estimar la diversidad genética de la caballa, Scomber japonicus, en el mar peruano*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

89
**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO CON MENCIÓN EN HIDROBIOLOGÍA Y PESQUERÍA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 18:10 horas del 25 de setiembre de 2017 en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en **Hidrobiología y Pesquería** de **JUAN LUIS VALDEZ BAEZ**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 014-EPCB-2017, el titulado expuso su tesis: **"EVALUACIÓN DE MARCADORES INTRÓNICOS PARA ESTIMAR LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA CABALLA, *Scomber japonicus*, EN EL MAR PERUANO"** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 16, calificativo: aprobado con mención honrosa

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Biólogo con mención en **Hidrobiología y Pesquería** a **JUAN LUIS VALDEZ BAEZ** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 19:35 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 25 de setiembre de 2017.

Mg. IRIS SAMANEZ VALER
(PRESIDENTA)

Blgo. DANIEL ORE CHAVEZ
(ASESOR)

Blga. CARMEN YAMASHIRO GUINOZA
(MIEMBRO)

Mg. GIOVANNA SOTIL CAYCHO
(MIEMBRO)

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Ecología Molecular, por ser el laboratorio donde se realizó el presente trabajo de tesis, al Blgo. Daniel Oré por mi ingreso al laboratorio y asesoría, a Baldo y Miguel por sus comentarios y a los nuevos integrantes por sus comentarios sobre la presentación para su sustentación.

Al Blgo. Sergio Barahona, por su importante asesoría para emplear las técnicas aplicadas en este estudio, su inmediata disponibilidad a ayudar, brindar consejos técnicos y recomendaciones de trabajos publicados.

Al Blgo. Diego Deville, por su primera ayuda con las técnicas de extracción de ácidos nucleicos y PCR, por su presencia en los trabajos paralelos realizados durante este trabajo de tesis y por sus valiosos comentarios.

Al Blgo. Alberto Lopez, por la gestión de equipos de laboratorio que permitió el uso de la centrifugadora para la primera etapa de este trabajo.

A la Dra. Rina Ramirez, por su generosa disposición para el uso del Nanodrop para la cuantificación de ADN, a Paola Aguirre y los asistentes de Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía por su amable orientación en el uso de este equipo.

Al Mg. Tito Libio y a los integrantes del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología, que nos brindaron el reactivo y uso de equipos para la esterilización de materiales cuando fue necesario para continuar con las pruebas.

Al Dr. Oscar Acosta, por brindar el reactivo que fue necesario para continuar con las pruebas en laboratorio.

A Raúl García, José Solís y Ángel Romaní, por su constante apoyo y sincera amistad, antes, durante y después de esta tesis.

A José Santamaría, por su disposición para apoyar durante el largo periodo de trámites.

A la Sra. Diana de la Escuela de Ciencias Biológicas, por su amabilidad, paciencia y guía para resolver temas administrativos.

Al profesor César Córdova por su gestión administrativa durante el periodo final de trámites.

A la profesora Carmen Yamashiro, por su amabilidad, generosa disposición y continua comunicación que sumaron a que esta tesis cuente con apoyo del fondo de investigación de tesis de la universidad. Asimismo por su valiosa dedicación en la enseñanza de la orientación que permitió mi formación y la de mis compañeros de orientación.

Este trabajo de investigación fue financiado con el apoyo del Fondo de Promoción de Trabajo de Tesis de Pregrado del VRI-UNMSM (Código N° 161001027).

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN	1
2	MARCO TEÓRICO	3
2.1	Distribución geográfica	3
2.2	Descripción morfológica	3
2.3	Alimentación	4
2.4	Reproducción	5
2.5	Comportamiento	6
2.6	Unidades poblacionales en el Pacífico Suroriental	7
2.6.1	Pesquerías mundial y nacional	7
2.6.2	Pesquería mundial	7
2.6.3	Pesquería nacional	8
2.6.4	Situación actual	9
2.6.5	Estudios Genético Poblacionales en <i>Scomber japonicus</i> .	9
2.7	Fuerzas de evolución	10
2.7.1	Deriva génica	11
2.7.2	Flujo génico	11
2.7.3	Selección natural	12
2.7.4	Mutación	13
2.8	Estimados de diversidad genética	15
2.8.1	Riqueza alélica	15
2.8.2	Frecuencia alélica	15
2.8.3	Heterocigosidad observada (H_o)	15
2.8.4	Heterocigosidad esperada (H_e)	16
2.8.5	Contenido de Información polimórfica (PIC)	16
2.8.6	Coeficiente de endogamia (F_{is})	16
2.8.7	Equilibrio de Hardy Weinberg (HWE)	17
2.9	Marcadores moleculares	17
2.9.1	Marcador molecular	17
2.9.2	Exon-primed intron-crossing (EPIC-PCR)	18
2.9.3	Estudios relacionados a EPIC-PCR	19
3	Objetivos	22
4	Materiales	23
4.1	Materiales de laboratorio	23
4.2	Reactivos	24
5	Metodología	26
5.1	Localización de puntos de muestreo	26

5.2	Muestras de tejido	27
5.3	Extracción de ADN total	28
5.3.1	Visualización de ADN total mediante electroforesis	28
5.4	Cuantificación de ADN	29
5.5	Selección de primers	29
5.6	Amplificación de los intrones mediante PCR	31
5.7	Estandarización de PCR	32
5.8	Geles de Poliacrilamida (PAGE)	32
5.8.1	Preparación del gel de poliacrilamida	33
5.8.2	Corrida vertical	33
5.9	Tinción en nitrato de plata	34
5.10	Análisis de los resultados	35
6	Resultados	37
6.1	Estandarización de PCR	37
6.1.1	GnRH3-1, GnRH3-2, GnRH3-3, Am2B-3	39
6.1.2	Gh5, Am2B-1, Ck-7	40
6.1.3	Act-2, MHCII, Cam-4	41
6.2	Concentración de reactivos de PCR	42
6.3	Evaluación de marcadores	47
6.3.1	GnRH3-1, GnRH3-2 y GnRH3-3	47
6.3.2	Am2B-1 y Am2B-3	47
6.3.3	Act2, MHCII y Cam4	48
6.4	Genotipificación y Caracterización molecular del marcador Cam-4	52
7	Discusión	57
7.1	Estandarización de PCR	57
7.2	Presencia de pseudogenes	58
7.3	Genotipificación de los marcadores intrónicos	59
7.4	Caracterización del marcador Cam-4	61
7.5	Déficit de heterocigotos.	62
7.6	Alelos nulos	65
7.7	Desembarques de caballa	66
7.8	Evaluaciones genético-poblacionales en caballa	68
8	Conclusiones	70
9	Referencias bibliográficas	71
10	ANEXO	89
10.1	ANEXO	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información de las localidades de muestreo.	27
Tabla 2. Información de los primers usados para la amplificación de intrones.	30
Tabla 3. Condiciones iniciales para la amplificación de intrones en caballa (<i>Scomber japonicus</i>).	31
Tabla 4. Perfil de ciclaje inicial para las regiones intrónicas.	32
Tabla 5. Lista de marcadores intrónicos y temperaturas de annealing experimentales en caballa, <i>Scomber japonicus</i>	39
Tabla 6. Pruebas de la temperatura de annealing para los 10 marcadores intrónicos en caballa, <i>Scomber japonicus</i>	46
Tabla 7. Condiciones finales de estandarización de los 8 marcadores intrónicos evaluados en temperatura de annealing y reactivos de PCR.	46
Tabla 8. Frecuencias genotípicas (tabla a) y alélicas (tabla b) del marcador Cam-4 en caballa, <i>Scomber japonicus</i> , en el mar peruano.	52
Tabla 9. Frecuencias genotípicas y alélicas del marcador Cam-4 en caballa, <i>Scomber japonicus</i> , en la zona norte (Paíta), zona centro (Ventanilla) y zona sur (Ilo)..	53
Tabla 10. Frecuencias alélicas del marcador Cam-4 en caballa, <i>Scomber japonicus</i> , en la zona norte (Paíta), zona centro (Ventanilla) y zona sur (Ilo).	53
Tabla 11. Estimados de la diversidad genética del marcador Cam-4 en la caballa, <i>Scomber japonicus</i> , en el mar peruano y programas empleados.	56
Tabla 12. Valores de heterocigocidad observada (H_o) y esperada (H_e) empleando marcadores intrónicos empleados en otras especies	62
Tabla 13. Estudios empleando marcadores mitocondriales y nucleares en caballa <i>Scomber japonicus</i>	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica de la caballa, <i>Scomber japonicus</i> . Fuente: FAO	3
Figura 2. Mapa de localidades de muestreo. (1) Zona Norte (Paíta, Piura); (2) Zona Centro (Ventanilla, Lima); (3) Zona Sur (Ilo, Moquegua).....	26
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de extracción de ADN de caballa, <i>Scomber japonicus</i> mediante el método de Salting-out. Muestras provenientes de: (a) Paíta, zona norte; (b) Ventanilla, zona centro e (c) Ilo, zona sur.	38
Figura 4. Productos de PCR (GnRH3-1, GnRH3-2, GnRH3-3 y Am2B-3) a diferentes temperaturas de annealing, corridos en geles de agarosa (2%). (a) T° annealing: 55°C; (b) T° annealing: 60°C.	40
Figura 5. Productos de PCR (Gh5, Am2B-1 y Ck-7) a diferentes temperaturas de annealing, corridos en geles de agarosa (2%). (a) T° annealing: 45 y 50°C; (b) T° annealing: 55 y 60°C; (c,d) T° annealing: 45 y 60°C.	40
Figura 6. Productos de PCR a diferentes temperaturas de annealing (50, 55 y 60°C), corridos en geles de agarosa (2%). (a) Act-2; (b) MHCII; (c) Cam-4.	42
Figura 7. Electroforesis en geles de agarosa (2%) de amplicones obtenidos en la estandarización de reactivos de PCR. (a y b) GnRH3-1, pruebas de Taq(a) y MgCl ₂ (b); (c) GnRH3-2, pruebas de Taq y MgCl ₂ ; (d) Am2B-3, pruebas de MgCl ₂ ; (e, f) Am2B-1, variación de dNTPs; (g, h) Act-2, pruebas de dNTPs.	44
Figura 8. Electroforesis en geles de agarosa (2%) de amplicones obtenidos en la estandarización de reactivos de PCR. (a) Act-2, pruebas de MgCl ₂ y (b) pruebas de primers; (c) Cam-4, pruebas de dNTPs.	45
Figura 9. Geles de poliacrilamida (6%) en tinción en plata de amplicones de marcadores intrónicos (I parte). (9a) GnRH3-1; (9b) GnRH3-2; (9c) GnRH3-3 y Cam-4; (9d) Am2B-1.	49
Figura 10. Geles de poliacrilamida (6%) en tinción en plata con amplicones de marcadores intrónicos (II parte). (10a) Am2B-3; (10b) Act-2; (10c) MHCII. ...	50
Figura 11. Gel de poliacrilamida (6%) en tinción en plata con amplicones de marcadores intrónicos (III parte). Amplicones de Cam-4.	51
Figura 12. Representación gráfica de los alelos encontrados mediante geles de poliacrilamida (6%) en los 8 marcadores intrónicos.	51
Figura 13. Gráfica de frecuencia alélica de Cam-4 de la caballa, <i>Scomber japonicus</i> , por zonas.	54
Figura 14. Mapa de distribución de alelos del marcador Cam-4 en la caballa, <i>Scomber japonicus</i> , en el mar peruano.	55

RESUMEN

La caballa, *Scomber japonicus*, es un pez pelágico cosmopolita y es uno de los 5 principales recursos en la pesquería nacional y mundial. La evaluación del recurso se centra en aspectos biológicos, ecológicos y pesqueros; sin embargo, se conoce poco del aspecto genético de este recurso en el mar peruano, información fundamental para el manejo del recurso y su adaptación a las condiciones del cambio climático.

En el presente estudio se evaluó la diversidad genética de la caballa y se emplearon 10 marcadores moleculares (EPIC-PCR) en muestras de 3 zonas del Perú (norte, centro y sur). De estos, 8 marcadores intrónicos amplificaron, fueron estandarizados (se determinaron las condiciones de PCR), corridos en geles de poliacrilamida y genotipados. Se obtuvieron 3 marcadores monomórficos (GnRH3-1, GnRH3-2 y Act-2), 3 dimórficos (GnRH3-3, Am2B-1 y MHCII), y 2 polimórficos (Am2B-3 y Cam-4); de los cuales, Cam-4 fue el único polimórfico e informativo.

La diversidad genética en la población total de caballa empleando Cam-4 fue moderada (H_e : 0.422) con significativo desequilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) con un déficit de heterocigotos, con alto coeficiente de endogamia (F_{is} =0.69). A nivel local, las poblaciones de Paita (zona norte) e Ilo (zona sur) evidencian un significativo desequilibrio de HW mientras que la población de Ventanilla (zona centro) se halla en equilibrio. Posibles causas como la alta probabilidad de alelos nulos (raro en intrones) y el efecto hitchhiking podrían estar presentándose.

Palabras clave: Caballa, *Scomber japonicus*, mar peruano, marcadores intrónicos, EPIC-PCR, polimorfismo, diversidad genética

ABSTRACT

Chub mackerel, *Scomber japonicus*, is a cosmopolitan pelagic fish and is one of the 5 main resources in the national and world fishery. The evaluation of the resource focuses on biological, ecological and fisheries aspects; however, little is known about the genetic aspect of the chub mackerel population in the Peruvian sea, fundamental information for the management of the resource and its adaptation to the conditions of climate change.

In the present study the genetic diversity of mackerel was evaluated, 10 molecular markers were used in samples from 3 zones of Peru (north, center and south) using universal primers (EPIC-PCR). Of these, 8 intronic markers were amplified, standardized (determined PCR conditions), run on polyacrylamide gels and genotyped. Three monomorphic (GnRH3-1, GnRH3-2 and Act-2), 3 dimorphic (GnRH3-3, Am2B-1 and MHCII), and 2 polymorphic (Am2B-3 and Cam-4) markers were obtained; Of which, Cam-4 was the only polymorphic and informative.

Genetic diversity in the total chub mackerel population using Cam-4 was moderate (H_e : 0.422) with significant Hardy-Weinberg disequilibrium (HWE) with heterozygous deficit and a high inbreeding coefficient (F_{is} = 0.69). At the local level, the populations of Paita (northern zone) and Ilo (southern zone) show a significant disequilibrium of HW while the population of Ventanilla (central zone) is in equilibrium. Possible causes like the high probability of null alleles (rare in introns) and the hitchhiking effect could be occurring.

Keywords: *Scomber japonicus*, chub mackerel, Peruvian Sea, intronic markers, EPIC-PCR, polymorphism, genetic diversity.

1 INTRODUCCIÓN

La caballa (*Scomber japonicus*) es un pez pelágico de amplia distribución mundial y forma parte de los 5 recursos más importantes para la pesquería peruana y mundial (Estrella & Swartzman, 2010). El Pacífico Sudoriental es conocido por ser una de las zonas pesqueras más productivas en el mundo, caracterizada por la variación climática que influye en gran medida en su producción (Chavez et al., 2003).

Algunos temas centrales para el aprovechamiento de un recurso pesquero son la identificación de unidades poblacionales y el monitoreo, para regular el esfuerzo de explotación (Coyle, 1998). Al respecto, la información del recurso y las medidas de manejo, en Perú, se centran en evaluar aspectos biológicos (crecimiento, reproductivo), ecológico (trófico) y pesqueros (capturas, tallas) (Caramantín et al., 2008, 2009; IMARPE, 2013; Alegre, 2015; Caramantín, 2006). Sin embargo, el recurso caballa estuvo sobreexplotado y muy cerca de su capacidad máxima entre 1993 y 2003 (Caramantín, 2006). Si bien éstos son varios aspectos de la especie, dada la importancia del recurso para el país sería conveniente agregar una contraparte que otorgue información genética de la caballa en nuestro país que viene siendo escasa y fundamental; y conociendo que el colapso de la pesquería de la caballa (*Scomber japonicus*) ha sido reportado en una de las principales zonas de pesca para este recurso en el mundo (Cheng et al., 2015).

Actualmente se conoce que los recursos genéticos cumplirán un rol clave para la alimentación ante el cambio climático debido a que la diversidad genética intra-específica será la base para la adaptación a las condiciones cambiantes (FAO,

2015) por lo que sería necesaria la evaluación y caracterización de la diversidad genética que brindaría información sobre el estado genético poblacional de la caballa que representa un importante recurso económico y que cumple un vital rol dentro del Ecosistema de la Corriente Peruana, asimismo, contribuiría a las desiciones de manejo pesquero en el ámbito regional considerando su amplia distribución.

El estado genético actual de la población de la caballa se podría determinar mediante la evaluación de la diversidad genética empleando varios marcadores moleculares. La caballa ha sido evaluada anteriormente empleando la región hipervariable I (mitocondrial) y el microsatélite SJT18 (nuclear). Información proveniente de más marcadores ayudan a mejorar el conocimiento de la especie; en este estudio, se evalúan marcadores intronicos (nucleares), conocidos por acumular mutaciones, ser codominantes (mostrando información materna y paterna) y que han sido empleados en evaluaciones genético-poblacionales en peces e invertebrados, ayudando a determinar la diversidad genética así como la estructuración poblacional, información clave en la determinación de stocks pesqueros.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Distribución geográfica

La caballa, *Scomber japonicus*, es una especie oceánica cosmopolita, que habita en aguas templadas y cálidas del Océano Pacífico, Atlántico, Índico y mares adyacentes (Collette y Nauen, 1983). Habita sobre el talud continental desde la superficie hasta los 300 metros de profundidad, alcanzando los niveles más profundos durante el día (Lozano Rey, 1952; Collette y Nauen, 1983; Castro, 1991).

En el Pacífico Sudoriental se extiende desde Panamá hasta Bahía Darwin, en Chile, incluyendo las Islas Galápagos (Chirichigno y Cornejo, 2001, Castro y Santana, 2000; Caramantín et al., 2009). La caballa se distribuye a lo largo de toda la costa sobrepasando las 100 millas fuera de la costa, limitada por el frente de penetración de aguas oceánicas (Tsukayama, 1983).

2.2 Descripción morfológica

Descripción morfológica según Castro y Santana (2000)

Nombre científico: *Scomber japonicus*

Nombre común: Caballa, macarela, estornino, chub mackerel.

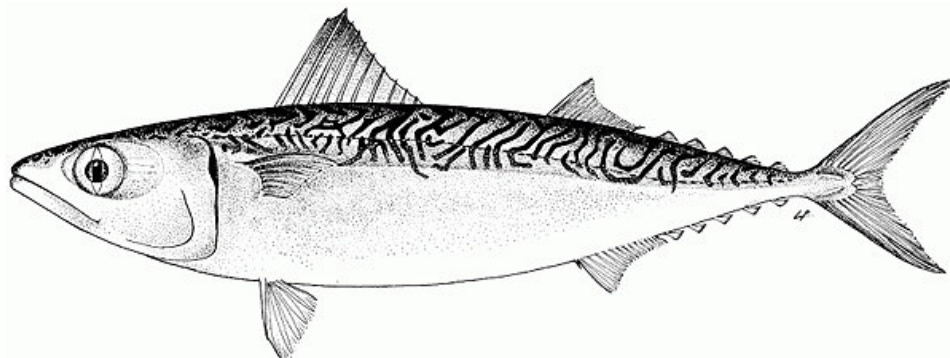


Figura 1. Representación gráfica de la caballa, *Scomber japonicus* Fuente: FAO

Scomber japonicus (Houttuyn, 1782) tiene el cuerpo fusiforme e hidrodinámico, de una forma alargada y redondeada con hocico puntiagudo, pedúnculo caudal delgado y aletillas dispuestas en una serie dorsal y ventral. La cabeza es pequeña y la mandíbula inferior ligeramente prominente. La boca es amplia y los dientes del adulto son delgadas, más aún en el vómer, proyecciones cónicas situado en una sola línea sobre cada uno de los premaxilares y mandíbulas.

La zona dorsal en peces vivos es de color verde pálido (verde oscuro a acero-azul en peces muertos), atravesado por líneas onduladas de azul acero débil. Las zonas inferiores son de color amarillo, el vientre plateado con numerosas manchas redondeadas oscuras que están ausentes en individuos muy jóvenes. Con vejiga natatoria presente. La primera aleta dorsal comprende de 9-10 espinas, la distancia desde la última espina dorsal (primera aleta dorsal) hasta el origen de la segunda aleta dorsal es menos que la longitud de la base de la primera aleta dorsal (Castro y Santana 2000; Collette y Nauen, 1983).

2.3 Alimentación

La caballa es un pez omnívoro y su alimentación depende de la disponibilidad y distribución de presas que a su vez dependen de condiciones ambientales (Kramer, 1969; Castro, 1991; Espinoza et al., 1998; Alegre, 2015). Los peces y el zooplancton (representados mayormente por los copépodos y los eufáusidos) son muy importantes en la dieta de la caballa (Miñano y Castillo, 1971; Antezana, 2010) y a pesar de que los ítems alimentarios de la caballa alcanzan una amplia variabilidad de grupos taxonómicos, la dieta con dominancia está conformada principalmente por zooplancton (Antezana, 2010; Alegre, 2015).

Los huevos y larvas de peces, moluscos, otros crustáceos y algas macroscópicas también están presentes pero con menor frecuencia (Mejía et al., 1970; Miñano y Castillo, 1971; Mendo, 1984; IMARPE & PRODUCE, 2009; IMARPE, 2013). Estos ítems alimentarios coinciden con los vistos en la caballa del Mar Argentino donde se evidencia el canibalismo sobre sus huevos (Pájaro, 1993), además de salpas y anfípodos en juveniles en Turquía (Sever et al., 2006). En el contenido estomacal de caballa, Miñano y Castillo (1971), encontraron los siguientes peces en orden de importancia: anchoveta (*Engraulis ringens*), caballa, anchoveta blanca (*Anchoa sp.*), machete (*Brevoortia maculata chilcae*) y sardina (*Sardinops sagax*).

Mendo (1984) reporta varios géneros de fitoplancton en el contenido estomacal (*Chaetoceros*, *Coscinodiscus*, *Thalassiosira* y *Skelotema*) que tienen una presencia relativamente alta y constante; sin embargo, se debería a que la caballa tiene un alto requerimiento de oxigenación y que al abrir la boca para ventilar de mejor manera las branquias estaría ingiriendo fitoplancton. La caballa no podría ser considerada como un pez filtrador debido al reducido número de branquiespinas en comparación con la anchoveta (filtrador), lo cual corroboraría lo anterior.

2.4 Reproducción

La caballa, en Perú, desova desde Cabo Blanco hasta San Juan (04° 0.1'S a 15° 30' S; Santander y De Castillo, 1972), fuera de las 100 millas de la costa y limitada por el frente de penetración de aguas oceánicas (Tsukayama, 1983), la principal zona de desove está confinada a la Dorsal de Nazca. Realiza fertilización externa y presenta reproducción parcial o asincrónica debido a una actividad gonadosomática constante, es decir, que desova más de una vez en el año mediante baches o tandas (Peña et al., 1986; Buitrón y Perea, 1998). Aunque el desove se da durante todo el año, las principales temporadas de desove de la caballa peruana se dan en verano

(de Enero a Marzo) y a fines de primavera (el segundo periodo importante pero de menor intensidad) (Miñano y Castillo, 1971; Mejía et al., 1970; Mendo, 1984). Caramantín et al. (2009) concuerda con los anteriores autores obteniendo los más altos valores de Índice Gonadosomático (IGS) en verano. Respecto a la talla de primera madurez, esta fue estimada por algunos autores con ligeras variaciones, siendo de 31,5 cm y una proporción sexual de 1:1 (Miñano y Castillo, 1971); y de 32.25- 34.2 cm (Mendo, 1984).

2.5 Comportamiento

La caballa es una especie gregaria y se desplaza en cardúmenes. Este comportamiento lo observó Watanabe (1970) quien reportó que larvas de caballa de aproximadamente 30 mm ya empezaban a presentar este comportamiento.

En el Pacífico Suroriental es frecuente encontrarla en cardúmenes uniformes, donde todos los individuos son conespecíficos; y en cardúmenes mixtos con *Trachurus symmetricus* y *Sardinops sagax* (Gutiérrez et al., 2007). Se ha observado que estos cardúmenes se conforman de individuos de tallas similares, sean uniformes o mixtos (Martínez et al., 2006). En las Islas Canarias, Castro (1991) encontró juveniles de caballa formando cardúmenes con individuos de *Sardina pilchardus*, *Boops boops* y *Atherina presbyter*. Además se observó en el Mar de Japón que los cardúmenes de caballa variaban en talla y que podían incluir de 50 000 a 100 000 especímenes.

2.6 Unidades poblacionales en el Pacífico Suroriental

Esta especie habita frente a las costas del Océano Pacífico desde Asia hasta América. Stepien y Rosenblatt (1996) anotaron que los trópicos se convierten en una barrera entre las poblaciones norte y sur de caballa a lo largo del Pacífico Sudeste. Referente a la identificación de unidades poblacionales en el Pacífico Suroriental, área que abarca las costas de Ecuador, Perú y Chile; la información bibliográfica es reducida (IFOP, 2007) pero hay dos trabajos al respecto:

- Los resultados de Serra et al. (1982), basándose en estudios sobre áreas de desove sugieren la existencia de dos poblaciones, una en la zona norte-centro de Perú y la otra en el norte de Chile. Estudios hechos en Ecuador (García, 1983) y Perú (Santander y De Castillo, 1972) acerca de áreas de desove refuerzan esta teoría (IFOP, 2007).
- Por otro lado, Dawson (1986) consideró parámetros de crecimiento para destacar que hay dos stocks en el Pacífico Suroriental, un stock abarcaría Ecuador y el norte de Perú; y el otro stock las aguas del sur de Perú y Chile, habiendo una zona central de mezcla entre estos dos stocks. Esto coincide con lo visto en otros estudios (Menz y Pizarro, 1988; IFOP, 2007).

2.6.1 Pesquerías mundial y nacional

2.6.2 Pesquería mundial

Las capturas de este recurso son reportadas a FAO desde 13 áreas de pesca, pero la mayor parte proviene del área 61 (Pacífico Noroeste, Mar de Japón y China) y el

área 34 (Atlántico Centro-oriental, oeste de África); algunos países han manejado esquemas de manejo y regulaciones locales para proteger los stocks como, por ejemplo, Japón y China (Ishida et al., 2009; Hiyama et al., 2002; Chen et al., 2009).

Los stocks de caballa están plenamente explotados en el Pacífico Este y sobreexplotados en el Pacífico Noroeste (FAO, 2016). Actualmente se ubica en el quinto lugar en desembarques a nivel mundial, con 1.5 - 1.8 millones de toneladas (FAO, 2014; FAO, 2016).

2.6.3 Pesquería nacional

La caballa, *Scomber japonicus*, junto con la anchoveta (*Engraulis ringens*), sardina (*Sardinops sagax*) y el jurel (*Trachurus murphyi*) son los principales recursos que contribuyeron al desarrollo de una de las principales pesquerías a nivel mundial, la pesquería peruana (Alegre et al., 2013).

En el Perú, la pesquería de este recurso se inició en los años 60's, a comienzos de la siguiente década llegó a 410 302 t pero en 1972 hubo un declive drástico de los desembarques de la anchoveta *Engraulis ringens* (hasta la décima parte de su biomasa total inicial) debido al evento El Niño 1971-1972 y a una intensa presión pesquera. Adicionalmente, se generó un gran cambio en la estructura comunitaria de peces pelágicos (Jordán, 1983), con aumento en las capturas de sardina, *Sardinops sagax*; jurel *Trachurus symmetricus murphyi*; y caballa *Scomber japonicus* (incremento de 70%, 81% y 100% respectivamente). Luego en los años 80's el recurso incrementó su producción llegando a 362 000 t. Luego se dio una declinación en el periodo 2000-2003 y esto ha persistido (Caramantín et al., 2008), capturándose en 2007, 52 000 t. En el periodo 2013 - 2014 se mantuvo entre 33 000 y 34 000 t aproximadamente (IMARPE, 2013; IMARPE, 2014). Los principales

puertos de desembarque son Chimbote, Chicama, Paita, Végueta, Chancay y Pisco.

2.6.4 Situación actual

En la economía peruana, la caballa es importante por su abundancia y valor comercial, siendo utilizado principalmente para la producción de alimentos a base de pescado (harina y aceite) y como un recurso alimenticio para la población. Actualmente se encuentra en tercer lugar de importancia entre las especies pelágicas de importancia pesquera, después de la anchoveta y el jurel (Estrella y Swartzman, 2010).

Caramantín (2006) menciona que la población de caballa fue sobreexplotada o que estaba próxima a la capacidad máxima basándose en modelos de rendimiento por recluta y análisis de cohorte, entre 1993 y 2003. Además se estableció para la caballa, entre otras especies, el uso exclusivo de consumo humano directo y la explotación racional de los recursos en un contexto de conservación y sostenibilidad de este recurso mediante el Reglamento de Ordenamiento Pesquero de Jurel y Caballa (DS N°. 001-2002-PRODUCE, DS N°. 011-2007-PRODUCE; Ñiquen et al., 2013). La talla mínima de captura es de 29 cm de longitud de horquilla y 32 cm de longitud total con una tolerancia máxima de 30% (Zuzunaga, 2013).

2.6.5 Estudios Genetico Poblacionales en *Scomber japonicus*.

El stock de *Scomber japonicus* del Pacífico Noreste ha sido ampliamente estudiado a nivel genético poblacional. Primeramente estudios morfométricos y basados en alozimas en la población de *S. japonicus* que habita frente a Taiwan reportó dos stocks del recurso frente a Taiwan (Lin, 1998; Tzeng & Yeh, 2007), pero

posteriormente con el análisis de secuencias de la región de control mitocondrial se sugirió la presencia de una sola unidad poblacional en las costas de Taiwan (Tzeng et al., 2007).

En el mar de China, se detectaron mediante microsatélites la presencia de dos stocks con altos niveles de diversidad genética ($H_e = 0.7$) y moderada diferenciación genética ($F_{st}=0.067$) entre las poblaciones del Este y el Sur de China (Zeng et al., 2012). Similar estructuración fue detectada con secuencias del gen citocromo b (Zhu et al., 2014). Cheng et al. (2015) mediante microsatélites detectaron tres poblaciones en el Pacífico Norte: Mar Este de China, Mar Amarillo y Mar de Japón.

El stock de *Scomber japonicus*, que habita en el Pacífico Suroeste, en el mar peruano ha sido recientemente estudiado. Barahona (2014), realizó el primer estudio genético poblacional en esta población, usando la región hipervariable I del ADN mitocondrial revelando una alta diversidad haplotípica ($H_d = 0.859$) y baja diversidad nucleotídica ($\pi = 0.0094$), con una graduación latitudinal de la diversidad local, mayor al sur y menor al norte. Con escasa o débil diferenciación poblacional ($F_{st} = 0.013$), concluyendo en la presencia de una sola unidad poblacional. Así mismo se detectó que esta población había atravesado un evento de expansión poblacional reciente, semejante escenario se ha descrito para otras especies ícticas en el mismo hábitat: la merluza (Ore, 2011) y pejerrey (DeVille, 2016).

2.7 Fuerzas de evolución

La variabilidad genética en una población es afectada principalmente por los siguientes factores: la deriva génica, la selección natural, mutación y flujo génico (que tienen efectos generales o particulares). La deriva génica actúa reduciendo la cantidad de variabilidad mientras que la mutación aumentándola; otros factores como la selección y el flujo génico pueden incrementar o reducir la variabilidad según la situación (Levin, 2009). Ningún factor actúa únicamente a la población (Freeland et

al., 2011), la combinación de estos factores puede generar diferentes niveles y patrones de variabilidad genética (Levin, 2009).

2.7.1 Deriva génica

La deriva génica es una fuerza evolutiva y se refiere a cambios aleatorios en la frecuencia alélica producto de una variación de muestreo de gametos (sampling) de una generación a otra, durante la reproducción (Avice, 2004). La deriva y la selección natural son las causas más importantes de sustitución alélica en las poblaciones (Futuyma, 2005; Graun & Li, 2000). Esta fuerza evolutiva se hace más evidente en poblaciones pequeñas (Templeton, 2006, Freeland et al., 2011), afectando el desempeño de estas, como es el caso de las poblaciones animales bajo condiciones de cautiverio (Allendorf, 1986).

Los cambios de la frecuencias alélicas no pueden ser predichas exactamente en dirección, ni en magnitud y no tienen una tendencia a retornar a las frecuencias alélicas ancestrales. Por lo general se espera que la desviación a causa de la deriva sea mayor desde las condiciones iniciales hacia generaciones siguientes en el tiempo. La deriva génica genera pérdida de variabilidad genética en las poblaciones, mediante la pérdida y fijación de alelos, en ausencia de selección, lo que reduce el potencial evolutivo de las poblaciones (Allendorf, 1986; Templeton, 2006; Freeland et al., 2011).

2.7.2 Flujo génico

Las poblaciones son frecuentemente divididas en unidades más pequeñas debido a factores geográficos (su hábitat no es continuo), ecológicos o de comportamiento como la territorialidad en aves o la formación de colonias en insectos (Levin, 2009).

El flujo génico es el movimiento de alelos de una población a otra y es uno de los más importantes determinantes de diferenciación genética. El flujo génico mediante dispersión, que se refiere al movimiento de individuos o propágulos entre poblaciones; o migración, movimiento periódico de individuos de o hacia una locación determinada; solo se considera válida para los individuos que se reproduzcan en la población a la que migraron (Eguiarte et al., 2007; Freeland et al., 2011).

El flujo génico mantiene la conectividad entre los subgrupos o subpoblaciones y difiere en magnitud entre subgrupos. Cuando el flujo génico entre las subpoblaciones es alto, hay una homogeneización de la variabilidad genética entre estas unidades; pero cuando el flujo génico es bajo entre estas, la deriva génica, la selección y hasta la mutación intervienen pudiendo dirigir a las subpoblaciones a una diferenciación genética (Levin, 2009).

Si bien el flujo génico es considerado frecuentemente como una fuerza limitante en evolución debido a su efecto homogeneizador sobre la población, Wright enfatiza en que puede ser una fuerza creadora en evolución debido a que con el flujo se pueden adquirir alelos y combinaciones de estos (Slatkin, 1987).

2.7.3 Selección natural

La selección natural es la fuerza evolutiva que lleva a la reproducción diferencial de organismos genéticamente distintos o genotipos en una población, afectando las frecuencias genéticas y generando un incremento o reducción de la variabilidad genética (Graur & Li, 2000; Freeland et al., 2011).

La reproducción diferencial entre individuos se debe a diferencias relacionadas a la mortalidad, fertilidad, fecundidad, éxito para conseguir pareja y viabilidad de la descendencia

El papel de la selección es ampliamente aceptada referente a caracteres morfológicos; sin embargo, su importancia a nivel molecular se encuentra en continuo debate (Eguiarte et al, 2007).

La selección puede ser considerada de dos tipos: la selección positiva y la negativa. La selección positiva es un mecanismo por el que los nuevos mutantes poseen adecuaciones mayores que el promedio de individuos de la población y la frecuencia de estos mutantes aumenta. En la selección negativa los mutantes muestran una adecuación debajo del promedio de los individuos de la población y su frecuencia disminuye (Graur & Li, 2000).

2.7.4 Mutación

El proceso de replicación del ADN generalmente produce secuencias idénticas; sin embargo, en algunas raras ocasiones se producen errores tanto en la replicación como en la reparación del ADN generando nuevas secuencias. A este proceso que ocurre a nivel molecular se le llama mutación y es la fuente esencial de variación genética en la evolución (Templeton, 2006). Las mutaciones generadas son heredadas si estas se presentan en células germinales pero no cuando se dan en células somáticas. Estas últimas no poseen un papel importante en el proceso evolutivo (Graur & Li, 2000).

Las mutaciones pueden ser clasificadas de acuerdo a la longitud de la secuencia de ADN afectada por el evento mutacional, teniendo mutaciones que implican solo un nucleótido (mutaciones puntuales) y otras que se dan sobre varios nucleótidos contiguos en la secuencia (mutaciones segmentales). También pueden ser clasificadas de acuerdo al tipo de cambio en las secuencias, teniendo sustituciones (cambio de un nucleótido por otro; pudiendo ser transiciones o transversiones),

recombinaciones (reemplazo de una secuencia por otra), inserciones (adición de uno o más nucleótidos), deleciones (retiro de uno o más nucleótidos) e inversiones (al darse un giro de 180° sobre un segmento de la doble cadena de ADN de dos o más pares de bases). Las mutaciones en el ADN pueden no generar cambios en la secuencia de aminoácidos durante la traducción (mutaciones sinónimas) así como generar cambios (mutaciones no sinónimas). Las mutaciones sinónimas no generan modificaciones a nivel de las secuencias proteicas, sin embargo estas podrían generar nuevas zonas de splicing así como borrar otras zonas generándose alteraciones en la producción del polipéptido (Graur & Li, 2000).

Las mutaciones pueden producir diferentes efectos en un gen, algunas pueden ser adaptativas momentáneamente en una escala evolutiva, otras pueden ser neutras, es decir, no producen un efecto suficientemente fuerte como para estar selectivamente a favor o en contra del individuo que la presente. Además, la mutación que representa una ventaja o una desventaja en una población grande puede ser neutral en una población pequeña donde la deriva génica le daría un mayor peso a la selección (Drake et al., 1998).

2.7.4.1 Tasa de mutación

Debido a que las mutaciones son muy raras, la forma de estimar directamente las tasas de mutación es difícil y su determinación se basa en el uso de secuencias de ADN.

Las tasas de mutación varían dependiendo de la región de donde provienen, por ejemplo, la tasa de mutación nuclear promedio en mamíferos se estimó en $3-5 \cdot 10^{-9}$ sustituciones por sitio nucleotídico por año, mientras que los microsatélites en humanos tienen una tasa de mutación aproximada de 10^{-3} sustituciones por sitio nucleotídico por año, siendo esta última más alta (Graur & Li, 2000). Además se

conoce que la tasa de mutación mitocondrial en primates es 10 veces mayor que la tasa de mutación nuclear promedio (Brown et al., 1982).

2.8 Estimados de diversidad genética

2.8.1 Riqueza alélica

Es una de las medidas más simples y es el número promedio de alelos por locus. Esta medida es muy sensible al tamaño de la muestra y el número de alelos identificados dependerá en parte del número de individuos que son analizados.

2.8.2 Frecuencia alélica

Frecuencia alélica es el número de veces que se observa un alelo (x_i) dentro del total de alelos para un locus. Se determina de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\hat{p}_i = \frac{x_i}{n}$$

Donde: x_i = Número de veces contado para un alelo i determinado

n = Número de alelos

2.8.3 Heterocigosidad observada (H_o)

Estimado de diversidad genética obtenido de dividir el número de heterocigotos, en un locus en específico, entre el número total de individuos muestreados. Esta medida está influenciada por el número de individuos de la muestra.

$$H_o = \frac{\text{individuos heterocigotos}}{\text{número total de individuos analizados}}$$

2.8.4 Heterocigosidad esperada (He)

Conocida como diversidad génica (Nei, 1973) y es la probabilidad de que dos alelos elegidos al azar de una población sean diferentes uno del otro. En una población con apareamiento al azar, He, debería ser la frecuencia de heterocigotos esperada si la población estuviera en HWE y tiene una ventaja sobre los demás estimados producto de que es menos sensible a los efectos de la muestra (Freeland, 2011).

$$He = 1 - \sum p_i^2$$

Donde p es la frecuencia del alelo i

2.8.5 Contenido de Información polimórfica (PIC)

Esta medida de polimorfismo determina la habilidad de un marcador de reconocer el polimorfismo en la población, esta habilidad discriminatoria está en función del número de alelos y frecuencia alélica.

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 p_i^2 p_j^2$$

PIC fluctúa entre 0 y 1, cuando los valores de PIC >0.5 el marcador presenta un alto grado de polimorfismo y cuando PIC <0.25 indica un bajo grado de polimorfismo.

2.8.6 Coeficiente de endogamia (Fis)

Índice que estima la desviación de las frecuencias genotípicas observadas de las esperadas (reducción de la heterocigosidad). Medida del grado de endogamia en los individuos.

$$F_{IS} = \frac{H_s - H_i}{H_s}$$

El coeficiente tiene un rango de -1 a 1, si el índice es 0 o cercano, no hay endogamia y la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. Cuando el valor es -1 significa que hay exceso de heterocigotos y si es 1 hay un exceso de homocigotos. Cuando $H_o < H_e$ suele asumirse que se produjeron apareamientos endogámicos o no al azar en esa población (Eguiarte et al., 2007).

2.8.7 Equilibrio de Hardy Weinberg (HWE)

Es uno de los conceptos básicos en genética de poblaciones establece que la proporción genotípica se mantiene en el tiempo en ausencia de selección, deriva génica, flujo génico y mutación y en una población panmíctica (con apareamiento al azar, infinitamente grande) donde todos los individuos tienen la misma probabilidad de sobrevivir y reproducirse. Este principio permite la simplificación de la descripción de una población debido a la reducción del número de parámetros que son considerados (Levin, 2009).

2.9 Marcadores moleculares

2.9.1 Marcador molecular

Las mutaciones son cambios en las secuencias nucleotídicas ocasionadas por error en la replicación del ADN o producto de agentes ambientales que ocurren dando paso a la variabilidad genética que puede llevar junto con otras fuerzas evolutivas como la selección y la deriva génica a generar diferenciación desde individuos hasta niveles taxonómicos de mayor jerarquía (Pérez, 1997; Liu y Cordes, 2004; Chauhan y Rajiv, 2010).

Los marcadores moleculares se han convertido en poderosas herramientas para detectar estas variaciones genéticas combinados con nuevos métodos estadísticos.

Los marcadores moleculares incluyen a los basados en proteínas (isoenzimas) y a los basados en ácidos nucleicos (marcadores ADN), sin embargo, hay autores que consideran solo a estos últimos. Si bien los proteicos o bioquímicos son útiles y los primeros en desarrollarse, hoy en día son de mayor uso los marcadores basados en ADN, debido a que muestran niveles más altos de variación y pueden evidenciar mutaciones que otros marcadores no; además es posible analizar tres tipos de genoma distintos, el nuclear, mitocondrial y cloroplastidial con características evolutivas y tasas mutacionales distintas (Fuch & Hamrick, 2010; Pérez, 1997; Okumus y Çiftci, 2003).

2.9.2 Exon-primed intron-crossing (EPIC-PCR)

La técnica EPIC-PCR es usada en organismos con escasa información genética disponible y permite realizar estudios genéticos a nivel de especie (Jennings y Etter, 2011). A diferencia de otros marcadores nucleares muy usados, los marcadores EPIC no requieren de mucho esfuerzo para el diseño de primers y los cebadores que son usados para un taxón pueden ser usados también para otros taxa, primers universales (Li et al., 2010; Jennings y Etter, 2011). Por otra parte, la presencia de alelos nulos es menos frecuente (Bierne et al., 2000; Carvajal-Vallejos et al., 2010) que usando otros marcadores como los microsatélites (Berrebi et al., 2005).

Durante la elaboración de los primers se toman en cuenta los exones que son regiones codificantes y conservadas que serán el punto de inicio, donde se anclarán los primers para empezar la amplificación; la fuente de información, la región intrónica entre las regiones exónicas flanqueantes es la que será clonada por amplificación cruzada (Atarhouch et al., 2003). Las regiones intrónicas son útiles para encontrar polimorfismo en los eucariotas, esto debido a que acumulan

fácilmente las mutaciones sin que esto signifique una alteración a la funcionalidad de los genes (Chow et al., 2015).

Además no solo la información de los intrones la vuelve útil sino que al amplificar se obtienen también segmentos de las regiones exónicas lo que permite tener mayor alcance para estudios de variabilidad genética intra- e inter-específica en especies complejas (France et al., 1999; Li et al., 2010); estas regiones exónicas podrían además ser potencialmente útiles como marcadores filogenéticos en el caso que tuvieran niveles apropiados de polimorfismo (Jennings y Etter, 2011).

2.9.3 Estudios relacionados a EPIC-PCR

El desarrollo de marcadores moleculares se ha visto beneficiado del crecimiento de los genomas accesibles para el público así como de herramientas bioinformáticas. Las especies no modelo y que no son muy conocidas no solo se han visto favorecidas por esto sino por la variedad de técnicas que se pueden aplicar con la PCR, en este caso EPIC-PCR (Jennings y Etter, 2011).

Chow (1998) hizo uso de la secuencia de ADN del gen de la calmodulina de humano y de *Oryzias latipes* de otros estudios para diseñar primers que luego fueron usados en varias especies de tñidos, “pez espada”, “pez globo”, “salmón” y humano; amplificando para la mayoría de ellos incluyendo especies distantes. En el 2008, Backström et al. desarrollaron marcadores intrónicos para una especie no modelo *Taeniopygia guttata*, “ave diamante cebra”, comparando las secuencias objetivo expresadas con las secuencias del genoma del pollo demostrando su potencial como primers universales. Atarhouch (2003) evaluó los intrones en los genes de la opsina (Ops-1), de la cadena ligera de la miosina (Mic-3), de la actina (Act-2), de la

quimiotripsina (ChymB-6) y calmodulina (Cam-3) en especies de peces marinos y dulceacuícolas, mamíferos y reptil y notó un alto nivel de universalidad ya que amplificaron para la mayoría de especies.

En el estudio realizado por Chow y Nakadate (2004) se evaluó el intrón 4 del gen G6PD, de mamífero y pez obtenidas de data publicada (Martini et al., 1986; Mason et al., 1995) lográndose amplificar para *Thunnus alalunga* y notar alelos y genotipos, también para una especie cercana *Thunnus thynnus thynnus*, “atún de cola azul”, notando variaciones de longitud; y *Colola bissaira*, “paparda del pacífico”, especie distante. Este tipo de marcador también fue probado en invertebrados (Bierne et al., 2000); en *Penaeus sp.*, langostino común donde amplificó y mostró que el gen de amilasa y el del factor de elongación 2 fueron polimórficos y a pesar de que tuvo un limitado número de alelos tuvieron un alto nivel de heterocigosidad. Los marcadores intrónicos fueron empleados en protobranquios (bivalvos no modelo) y resultaron ser ideales en genética de poblaciones, y para la obtención de secuencias preliminares para el diseño de primers específicos (Jennings y Etter, 2011)

Por otra parte se compararon los genomas completos de 5 peces (*Danio rerio*, *Oryzias latipes*, *Gasterosteus aculeatus*, *Takifugu rubripes* y *Tetraodon nigroviridis*) y se encontraron 210 marcadores EPIC potenciales. Los resultados del uso de estos marcadores formaron los grupos taxonómicos clásicos conocidos con lo que se sugiere que los marcadores EPIC también serían útiles para inferir relaciones filogenéticas (Li et al., 2010). Especies de peces dulceacuícolas con potencial de cultivo como *Zacco platypus* en China (Berrebi et al., 2005) y el “tucunaré”, *Cichla pleiozona*, en Bolivia (Carvajal-Vallejos et al., 2010) han sido estudiadas para obtener información acerca de su estructura filogeográfica (con 5 de 27 sistemas intrónicos informativos) y poblacional (marcadores EPIC y mitocondriales), respectivamente.

Los marcadores intrónicos han sido empleados en estudios de genética poblacional (Corte-Real et al., 1994; Atarhouch et al., 2007; Borsa et al., 2012; Vasconcellos et al., 2015). Empleando estos marcadores se evaluó la población de *Sardina pilchardus* en Marruecos, usando CaM-4 y Ops-1 determinando que habían dos grupos muy marcados (Atarhouch et al., 2007); en las poblaciones de tres rayas *Himantura gerrardi*, *Neotrygon kuhlii* y *Taeniura lymna* en el archipiélago Indo-Malay-Papua encontraron marcadas diferencias (Borsa et al., 2012). La estructura genética de *Micropogonias furnieri*, en las costas de Brasil, también fue analizada usando marcadores intrónicos y microsatélites diferenciando 3 unidades poblacionales (Vasconcellos et al., 2015). Los resultados presentan a estos marcadores como aplicables en estudios de genética poblacional (Chow y Takeyama, 1998; Atarhouch et al., 2003), en la delimitación de stocks e identificación de unidades genéticas (Borsa et al., 2012) lo que mejora los alcances para la elaboración de planes de manejo de especies explotadas.

3 OBJETIVOS

Objetivo principal

- Evaluar marcadores intrónicos para la estimación de la diversidad genética de la caballa *Scomber japonicus* en el mar peruano.

Objetivos secundarios

- Estandarizar la reacción de amplificación por PCR para 10 marcadores intrónicos en la caballa *Scomber japonicus*.
- Determinar el grado de polimorfismo de los marcadores intrónicos aplicados en la caballa *Scomber japonicus*.
- Determinar la variabilidad genética de la caballa *Scomber japonicus* en el mar peruano empleando marcadores intrónicos.

4 MATERIALES

4.1 Materiales de laboratorio

- Autoclave
- Balanza digital, OHAUS, Scout® Pro (sensibilidad 0.01 g).
- Cámara electroforética horizontal (SIGMA)
- Cámara fotográfica Canon PowerShot SD780 IS
- Cocinilla eléctrica
- Congeladora vertical (Frigidaire)
- Estufa
- Fuente de poder(HoeferScientific Instruments)
- Horno Microondas (LG)
- Micropipetas High Tech Lab y Rainin(0.1-2uL; 0.5-10uL; 5-50uL; 20-200uL; 100-1000uL)
- Refrigeradora (Coldex)
- Termociclador (AppliedBiosystem 2720)
- Transiluminador UV (Fotodyne 3-300)
- Microcentrífuga (HETTICH D-7200)
- Baguetas
- Beakers de Pyrex (100 ml)
- Espátulas
- Gradillas
- Guantes de protección
- Matraces de pyrex (250 ml y 500ml)
- Papel Parafilm
- Papel aluminio y papel toalla
- Pinzas metálicas

- Placas Petri
- Probetas de Pyrex(10 ml y 100ml)
- Puntas para micropipetas
- Recipientes de 500 ml
- Tubos para PCR
- Tubos de 50ml (Falcon)
- Viales de vidrio de 20 ml con tapa de goma a presión

4.2 Reactivos

- Alcohol etanol 96°
- Cloroformo : Alcohol isoamílico (24:1)
- Agarosa
- Acrilamida
- Agua de PCR (NFW)
- Alcohol isopropanol
- Bis-acrilamida
- Bromuro de etidio
- Buffer 10 X PCR Fermentas®
- Buffer de corrida (TBE 1X)
- Buffer lisis TNES-Urea.
- Cloruro de magnesio
- Cloruro de sodio
- dNTPs Fermentas®
- Dodecilsulfato Sódico (SDS)
- EDTA
- Enzima Taq Polimerasa

- Nitrato de plata
- Persulfato de amonio (APS)
- Proteinasa K Bioline®
- Primers
- N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED)
- Tris-Base APPLICHEM®

5 METODOLOGÍA

5.1 Localización de puntos de muestreo

El área de estudio comprendió el mar peruano, para esto se tomaron muestras de caballa de 3 zonas: Zona Norte (Paíta), Zona Centro (Ventanilla) y Zona Sur (Ilo), en el periodo entre enero y marzo del 2013 y 2014. Las muestras proceden de la pesca artesanal fueron compradas en los terminales pesqueros de estas zonas. **Figura 2.**



Figura 2. Mapa de localidades de muestreo. (1) Zona Norte (Paíta, Piura); (2) Zona Centro (Ventanilla, Lima); (3) Zona Sur (Ilo, Moquegua).

5.2 Muestras de tejido

Las muestras de caballa forman parte de la colección de tejidos del Laboratorio de Ecología Molecular y Biología Acuática de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; estas son un total de 75 muestras de tejido muscular de la región dorsal de caballa (*Scomber japonicus*). **Tabla 1.**

El tamaño de los trozos fue de 0.5 cm x 0.5 cm aproximadamente, que fueron cortados, disgregados y lavados con agua destilada hasta retirar residuos para ser conservados en viales transparentes de vidrio con alcohol etanol 96° a -4°C.

Tabla 1. Información de las localidades de muestreo.

Localidades	Número de individuos (n)	Georeferencia (coordenadas)	Fecha de colecta	Colector
Paita (Zona Norte)	25	5°05'06.0"S 81°06'25.5"W	Marzo 2013	Barahona S.
Ventanilla (Zona Centro)	25	11°59'21.4"S 77°07'36.0"W	Enero 2013	Barahona S.
Ilo (Zona Sur)	25	17° 38'40.0"S 71°20'49.6"W	Febrero 2014	Barahona S.
Total	75			

5.3 Extracción de ADN total

Para la extracción del ADN genómico se utilizó la técnica de extracción con sales (Aljanabi y Martinez, 1997). Se tomó 0.2 g de muestra de tejido húmedo, se depositó en tubos Eppendorf de 1ml, se agregó 600 ul de TE 20:5 para disgregar el tejido e hidratarlo (hasta retirar restos de alcohol). Luego se agregó 300 ul de TNE-úrea (Tris 50mM, NaCl 400mM, EDTA 100mM, úrea 5M) para homogeneizarlo. Se adicionó 75 ul de SDS 10%, 5 ul de Proteinasa K e incubó a 60°C por 2 h como mínimo.

Al lisado se le agregó 500 ul de Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1), invertido y centrifugado a 7500 rpm por 5 min; luego se tomó 250 ul del sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se agregó NaCl con una concentración final de 0.25M e invertido (durante 3 min) y se agregó 250 ul de alcohol isopropanol frío para invertir e incubar a -20°C de 5-30 min. Luego se centrifugó a 7500 rpm por 15-20 min con presencia de precipitado blanquesino (pellet de ADN); se decantó y al pellet se le agregó alcohol etanol 70% (diluido con TE 20:5) para centrifugarlo a 7500 rpm de 15 – 20 min (2 veces).

Se retiró el alcohol y el tubo con el pellet se secó en la estufa de 35-40°C por 20 min; después se agregó 500 ul de TE 20:1 e incubó en 37-40°C por 20 minutos para resuspender el ADN y mantenerlo a -20°C.

5.3.1 Visualización de ADN total mediante electroforesis

El ADN total fue visualizado en geles de agarosa (1%) que fueron previamente diluidos en buffer TBE (1X). Se mezclaron 4ul de solución de ADN y 2 ul buffer de carga (azul de bromofenol y xilencianol), se cargaron al gel en la cámara de electroforesis y fueron corridos a 100V por 20 min aproximadamente. Luego los

geles fueron teñidos con bromuro de etidio durante 10-15 min, visualizados mediante un transiluminador UV y fotografiados.

5.4 Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN se realizó mediante un Nanodrop usando TE20:1 como solución blanco (solución de dilución) y 1ul de solución de ADN de cada muestra extraída. Los valores tomados fueron (1) concentración de ADN (ng/ul), (2) grado de pureza (radio absorbancia 260nm/absorbancia 280nm) y (3) absorbancia a 260nm (A260nm). Las concentraciones de ADN superiores a 50 ng/ul y valores de grado de pureza (A260nm/A280nm) superiores a 1.8 son suficientes para la amplificación y se consideran cantidades adecuadas.

5.5 Selección de primers

La técnica EPIC-PCR se basa en el uso de primers diseñados a partir de exones, es decir zonas conservadas y codificantes de los genes. Estos genes desempeñan roles fundamentales en el metabolismo de los organismos.

Cebadores usados en otros trabajos (Atarhouch et al., 2003; Chow, 1998; Hassan et al., 2002), se usaron para las pruebas de amplificación de 10 regiones intrónicas.

Tabla 2.

Tabla 2. Información de los primers usados para la amplificación de intrones.

Gen	Intrón	Nombre del Intrón	Nombre primer	Secuencia del primer (5' - 3')	Fuente de la secuencia	Referencia
Actina	2	Act-2	Act-2-F Act-2-R	GCATAACCCCTCGTAGATGGGCAC ATCTGGCACCACACACCTTCTACAA	Peces, pollo y <i>Drosophila</i> sp.	Atarhouch et al., 2003
Calmodulina	4	CaM-4	CALMex4F CALMex5R	CTGACCATGATGGCCAGAAA GTTAGCTTCTCCCCCAGGTT	<i>Humano</i> , <i>Oryzias latipes</i>	Chow, 1998
Complejo Mayor histocompatibilidad Clase II	1	MhcII	Mhc1F Mhc2R	ACTCTAATCTGGAGTACATGC CAGGAGATCTTCTCTCCAGCC	<i>Thunnus obesus</i>	Hassan et al., 2002
Hormona liberadora de Gonadotropina 3	1	GnRH3-1	GnRH1F	AATGCACCACATGCTAACCAAGGC	<i>Siganus rivulatus</i> , <i>Chaetodon citrinellus</i> , <i>Chaetodon citrinellus</i> , <i>Forcipiger flavissimus</i>	Hassan et al., 2002
	2	GnRH3-2	GnRH1R GnRH2F GnRH2R	CGCACCATCACTCTGCTGTTCGC AGAAGTGTGGGAGAGCTAGAGGC AGAGACACCACTTCTCCTGTACCC		
	3	GnRH3-3	GnRH3F GnRH3R	GCCCAACCCCAAGAGAGACTTAGACC TTCGGTCAAAATGACTGGAATCATC	<i>Siganus rivulatus</i>	Hassan et al., 2002
Alfa amilasa	1	Am2B-1	Am2b1F Am2b2R	CCTTCATCTTCCAGGAGGTAC TTCACCTCCCAGATCAATAAC	<i>Siganus rivulatus</i> , <i>Thunnus obesus</i>	
	3	Am2B-3	Am2b3F Am2b4R	TGGAACCGAAACATTGTGAAC CCCATCCAGTCATTCTGATCC	<i>Siganus rivulatus</i> y <i>S. luridus</i>	
Hormona de crecimiento	5	Gh-5	Gh5F Gh6R	AGGCCAATCAGGACGGAGC TGCCACTGTCAGATAAGTCTCC	<i>Thunnus obesus</i> (<i>Scombridae</i>)	
Creatina kinasa	7	Ck-7	Ck7F Ck8R	AAGAGGGTCTTTGACAGGTTCTGC TTC TCCTGGATCAGACGCTCCACC	<i>Thunnus obesus</i> (<i>Scombridae</i>)	

5.6 Amplificación de los intrones mediante PCR

Los volúmenes y las concentraciones de los reactivos necesarios en la preparación del Master Mix en la amplificación de los intrones en la primera fase bajo condiciones de baja astringencia se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones iniciales para la amplificación de intrones en caballa (*Scomber japonicus*)

Reactivos	Concentración Inicial (Ci)	Concentración Final (Cf)	Volumen inicial (ul)
Agua libre de nucleasas (NFW)	-	-	17.9 ul
Buffer	10x	1x	2.5 ul
MgCl ₂	25mM	2.5mM	2.5 ul
dNTPs	10mM	0.08 mM	0.2 ul
Primer (Forward)	10uM	0.12 uM	0.3 ul
Primer (Reverse)	10uM	0.12 uM	0.3 ul
Taq Polimerasa	5U/ul	1.5U	0.3 ul
ADN	-	-	1ul
Volumen Total			25ul

MgCl₂: Cloruro de magnesio, dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato, Taq Polimerasa: enzima Taq polimerasa, Buffer: Solución tampón.

El perfil de ciclaje para la amplificación inicial fue bajo las condiciones que aparecen en la **tabla 4**.

Tabla 4. Perfil de ciclaje inicial para las regiones intrónicas

Etapas de la amplificación	Fase	Temperatura (T°)	Tiempo
Inicial	Desnaturalización	95°C	5 min
	Desnaturalización	95°C	1 min
Ciclos (35 ciclos)	Alineamiento	60°C	1 min
	Extensión	72°C	45 seg
Final	Extensión	72°C	10 min

5.7 Estandarización de PCR

Para encontrar las condiciones óptimas en la amplificación de los intrones, se realizaron pruebas variando los componentes de la reacción: la temperatura de annealing (Ta) y la concentración de los reactivos como: primers, cloruro de magnesio (MgCl₂), dNTPs, Taq polimerasa y cantidad de ADN.

Para verificar los cambios realizados después de cada prueba en la estandarización del PCR, los amplicones fueron visualizados en geles de agarosa al 2%.

5.8 Geles de Poliacrilamida (PAGE)

La electroforesis vertical en ADN es una de las técnicas más usadas en biología molecular, posee una mayor resolución que los geles de agarosa separando entre moléculas que difieren hasta 2 pares de bases, con una limitación en el rango de detección de 5-600 pb.

5.8.1 Preparación del gel de poliacrilamida

La mezcla se realiza en un vaso de precipitación con poliacrilamida (21%), buffer de corrida (TBE 10x) y úrea sólida en baño maría y removiendo con una bagueta para mejorar la dilución de la úrea. Esta solución de poliacrilamida (21%) es la solución stock.

Láminas de vidrio de 20 x 30 cm fueron lavadas con lavavajillas y agua, enjuagadas con alcohol (97%) y dejadas secando a temperatura ambiente. Son necesarias dos láminas para cada gel de poliacrilamida, uno ligeramente más largo que el otro. A la lámina más pequeña (el cristal repelente) se le aplica una solución de Repel-Silane que es esparcida en una cara con papel. A la otra lámina (el cristal adherente) se le aplica solución BIND y se esparce en una cara con papel. Estas soluciones esparcidas permitirán la separación y la adhesión de gel a las láminas de vidrio respectivamente.

Las láminas fueron colocadas con las caras tratadas frente a frente, se colocaron citas separadoras y el peine, ambos de 0.5mm, a los lados para evitar el contacto entre las láminas y la formar pocillos. El espacio formado entre estas fue necesario para formar geles de poliacrilamida de 0.5 mm de espesor.

La cantidad necesaria de solución de poliacrilamida con úrea es mezclada con APS (10%) y TEMED en otro vaso de precipitación. De acuerdo a las dimensiones de los geles fue variando la cantidad de solución de poliacrilamida, APS y TEMED. La mezcla fue revuelta y vertida lentamente en el espacio formado entre las dos láminas de vidrio y se esperó a la polimerización.

5.8.2 Corrida vertical

Los geles de poliacrilamida fueron colocados en la cámara de electroforesis vertical con buffer de corrida (TBE 1x) en las dos cubetas. Luego se conectó la cámara a la fuente de poder para aplicar de 100 – 250 V por 10 min para alinear las moléculas de poliacrilamida y mejorar la corrida posterior.

Los amplicones visualizados en geles de agarosa fueron tratados antes de ser cargados al gel de poliacrilamida. Se separó 3 ul de amplicón y se mezcló con 3 ul de azul de bromofenol-formamida (1:1) en tubos de PCR de 200 ul, estos tubos fueron llevados mediante el termociclador a 95°C por 5 minutos para desnaturalizar las muestras. Los tubos pasaron por shock térmico, usando hielo, después de salir del termociclador.

El precalentamiento del gel y el tratamiento de los amplicones a altas temperaturas se dieron simultáneamente; los amplicones fueron cargados al gel inmediatamente después de su tratamiento y corridos a un voltaje de 250-500 V durante un tiempo variable dependiendo del tamaño de estos. El marcador de peso molecular fue colocado en el primer y/o último pocillo.

5.9 Tinción en nitrato de plata

Hay varios métodos de tinción de ácidos nucleicos en plata que varían en números de pasos, reactivos usados, tiempo requerido, nivel de complejidad (Bassam et al., 1991; Qu et al., 2005; Bassam y Gresshoff, 2007; Byun et al., 2009). Para la tinción de los geles de poliacrilamida en este trabajo se usó el método de Bassam et al. (1991, 2007) con modificaciones usando alcohol etanol (10%) en lugar de ácido acético (10%) en la etapa de fijación y obviando carbonato de sodio (3%) y tiosulfato de sodio (0.0002%) en la etapa de revelado.

El método usado tenía menor número de pasos, requería menor cantidad de nitrato de plata, era altamente sensible y no requería de pretratamientos de oxidación antes de la impregnación con nitrato de plata.

Terminada la corrida vertical:

- El gel es sumergido en una solución de etanol (10%) por 10 min para fijar las moléculas de ADN a la matriz del gel para evitar la difusión y la consecuente formación de imágenes borrosas. Además permite neutralizar sustancias químicas como la úrea o el buffer que podrían interferir en la tinción.
- Luego es sumergido en agua destilada durante 5 – 10 min, hasta hidratar el gel.
- Sumergido después en nitrato de plata (0.1%) y 3 ml de formaldehído (37%) por 15 - 20 min para teñirlo (Solución de tinción).
- Lavado con agua destilada por 10 seg (No se debe exceder este tiempo).
- Sumergido en una solución de hidróxido de sodio (1.5%) agregando 300 - 400 ul de formaldehído (37%) para revelar las bandas en el gel, este paso tiene un tiempo variable y termina cuando las bandas son visibles (Solución reveladora).
- Finalmente es sumergido en una solución de ácido acético (10%) para detener el proceso de revelado durante 5-10 min (Solución Stop).

En cada paso las bandejas con el gel sumergido fueron agitadas para mejorar el contacto de las soluciones con este y lograr una adecuada tinción del gel.

El uso del formaldehído tanto en la fijación como en el revelado permite obtener una mayor sensibilidad con las moléculas de ADN y un mejor contraste. El formaldehído reduce selectivamente los iones de plata a plata metálica bajo condiciones alcalinas.

5.10 Análisis de los resultados

Los resultados de los geles de poliacrilamida fueron usados para formar matrices con las que se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de los marcadores seleccionados.

El número de alelos (NA), la riqueza alélica (AR), el número de homocigotos y heterocigotos y el índice de endogamia (Fis) fueron para cada zona usando el programa Fstat 2.9.3.2. (Goudet, 1995). La cantidad de alelos privados, la heterocigosidad observada (Ho) y heterocigosidad esperada (He) así como gráficas con esta información para cada zona fueron obtenidas mediante el programa GenAlex 6.5 (Peakall y Smouse, 2012).

Los test de desviación del Equilibrio de Hardy Weinberg (HWE) fueron obtenidos mediante el programa Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier y Lischer, 2010). Los estimados de frecuencia de contenido de información polimórfica y alelos nulos para cada zona fueron obtenidos mediante el programa Cervus 3.0.3 (Kalinowski et al., 2007).

Se generó un mapa genético-geográfico con la información de diversidad genética de la caballa en el mar peruano mediante el programa ArcGis 10.3.

6 RESULTADOS

El valor promedio en la cuantificación de ADN genómico fue de 302.7 ng/ul, con la mayoría de muestras entre 100 y 500 ng/ul; la pureza promedio del ADNg (A260nm/A280nm) fue de 1.88. **Figura 3, Anexo 1.**

6.1 Estandarización de PCR

La amplificación de los marcadores fue optimizada: (1) se evaluó la amplificación a diferentes temperaturas de annealing, (2) se evaluó la concentración adecuada de reactivos de PCR.

Temperatura de annealing

La amplificación de una o más bandas evidenció el alineamiento de los primers con la región diana en el ADN bajo las temperaturas de annealing evaluadas (45°, 50°, 55° y 60°C). **Figuras 4, 5 y 6.** Se logró amplificar 8 de 10 marcadores; Gh-5 y Ck-7 no mostraron amplicones bajo ninguna de las condiciones de temperatura y fueron descartados para las siguientes pruebas. **Tabla 5 y 6.**

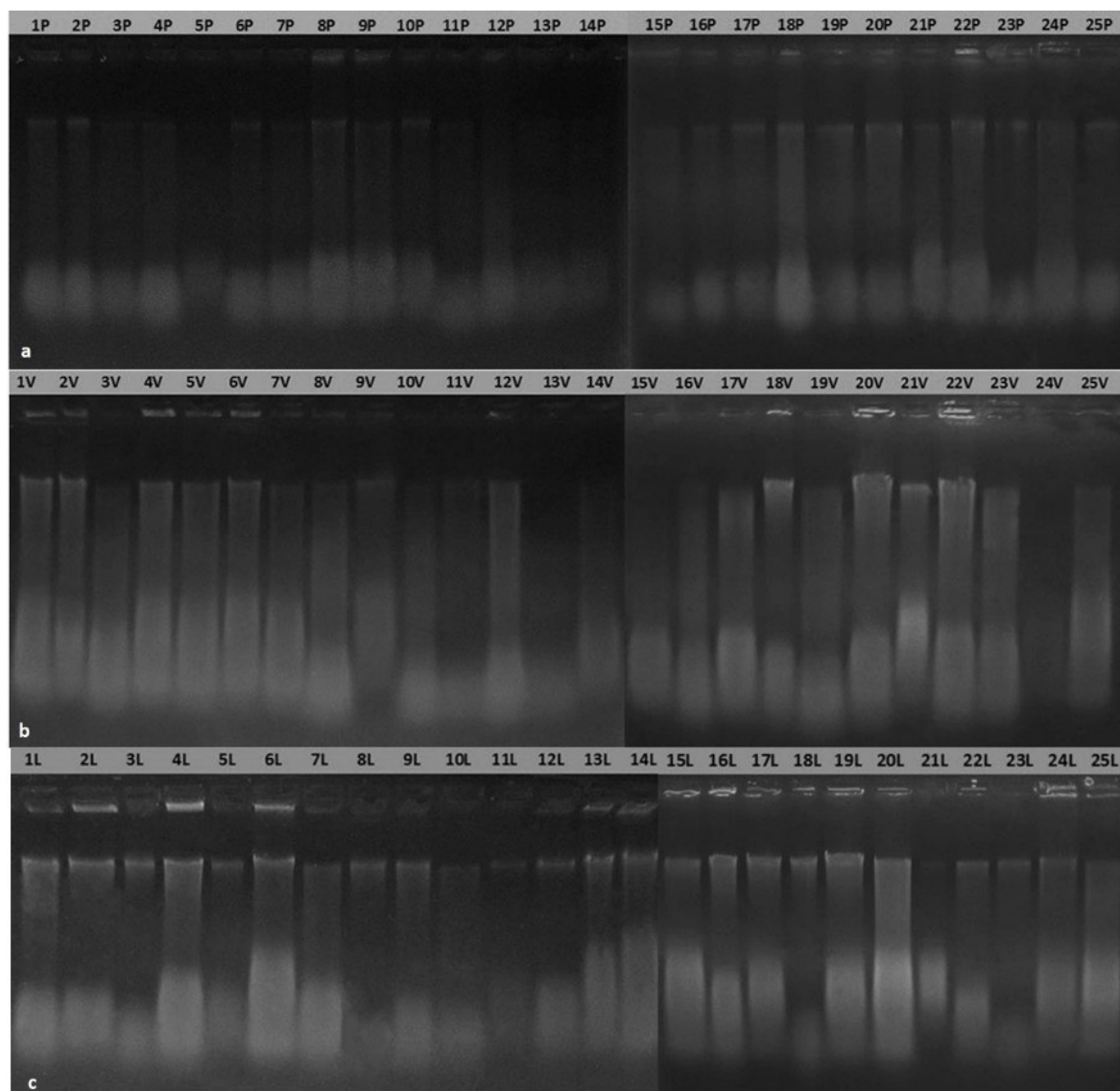


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de extracción de ADN de caballa, *Scomber japonicus* mediante el método de Salting-out. Muestras provenientes de: (a) Paita, zona norte; (b) Ventanilla, zona centro e (c) Ilo, zona sur.

Tabla 5. Lista de marcadores intrónicos y temperaturas de annealing experimentales en caballa, *Scomber japonicus*.

Nombre del Intrón	Nombre primer	T° annealing (*)	Especie evaluada (*)	T° annealing del presente estudio (<i>Scomber japonicus</i>)
Act-2	Act-2-F	58°C	<i>Scomber scombrus</i>	60°C
	Act-2-R	(2 loci)	(Scombridae)	
CaM-4	CALMex4F	60°C	<i>Thunnus albacares</i>	60°C
	CALMex5R		(Scombridae)	
MhcII	Mhc1F	52°C	<i>Thunnus obesus</i>	55°C
	Mhc2R	(multilocus)	(Scombridae)	
GnRH3-1	GnRH1F	48°C	<i>Siganus luridus</i>	55°C
	GnRH1R	(multilocus)		
GnRH3-2	GnRH2F	54°C	<i>Chaetodon quadrimaculatus</i>	60°C
	GnRH2R			
GnRH3-3	GnRH3F	52°C	<i>Thunnus obesus</i>	60°C
	GnRH3R		(Scombridae)	
Am2B-1	Am2b1F	48°C	<i>Thunnus obesus</i>	50-48°C
	Am2b2R		(Scombridae)	
Am2B-3	Am2b3F	58°C	<i>Siganus luridus</i>	60°C
	Am2b4R	(NA)		
Gh-5	Gh5F	52°C	<i>Thunnus obesus</i>	NA
	Gh6R		(Scombridae)	
Ck-7	Ck7F	45°C	<i>Thunnus obesus</i>	NA
	Ck8R		(Scombridae)	

(*) Atarhouch et al., 2003, Hassan et al., 2002 y Chow, 1998.

NA: No amplificó

6.1.1 GnRH3-1, GnRH3-2, GnRH3-3, Am2B-3

Los 3 intrones del gen de la hormona liberadora de gonadotropina -3 (GnRH3) fueron probados bajo 2 temperaturas de annealing (55° y 60°C). El intrón 1 de este gen (GnRH3-1), amplificó solo a 55°C; el intrón 2 (GnRH3-2) amplificó bajo ambas condiciones; no obstante, las bandas, correspondientes a 60°C como temperatura de alineamiento, eran más intensas y definidas. El intrón 3 (GnRH3-3) también amplificó bajo ambas temperaturas de annealing (55° y 60°C) con bandas intensas y definidas,

pero para mejorar la especificidad de la reacción se eligió la temperatura de 60°C (temperatura mayor) para las pruebas de estandarización siguientes.

El intrón 3 del gen alfa amilasa (Am2B-3) fue probado a 2 temperaturas de alineamiento (55° y 60°C) amplificando para ambos tratamiento. Los productos de la amplificación a 55°C mostraron bandas tenues; sin embargo, los amplicones bajo 60°C dieron bandas más intensas y definidas. La condición de 60°C fue mantenida para las siguientes pruebas de PCR.

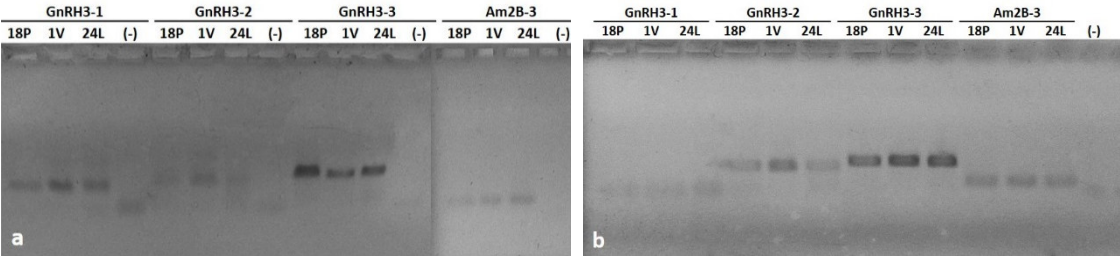
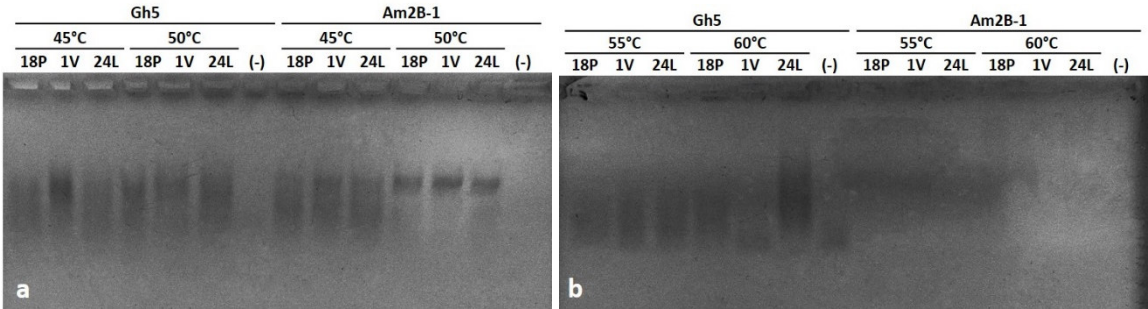


Figura 4. Productos de PCR (GnRH3-1, GnRH3-2, GnRH3-3 y Am2B-3) a diferentes temperaturas de annealing, corridos en geles de agarosa (2%). (a) T° annealing: 55°C; (b) T° annealing: 60°C.

6.1.2 Gh5, Am2B-1, Ck-7

El intrón 5 del gen de la hormona de crecimiento (Gh5) no amplificó bajo ninguna temperatura de annealing probada (45°, 50°, 55° y 60°C). El intrón 1 del gen alfa amilasa (Am2B-1) fue probado bajo 4 temperaturas de alineamiento (45°, 50°, 55° y 60°C) y solo



presentó amplicones con forma de banda a 50°C. Las pruebas de amplificación del intrón 7 de creatina quinasa (CK7) a 45° y 60°C no dieron amplicones.

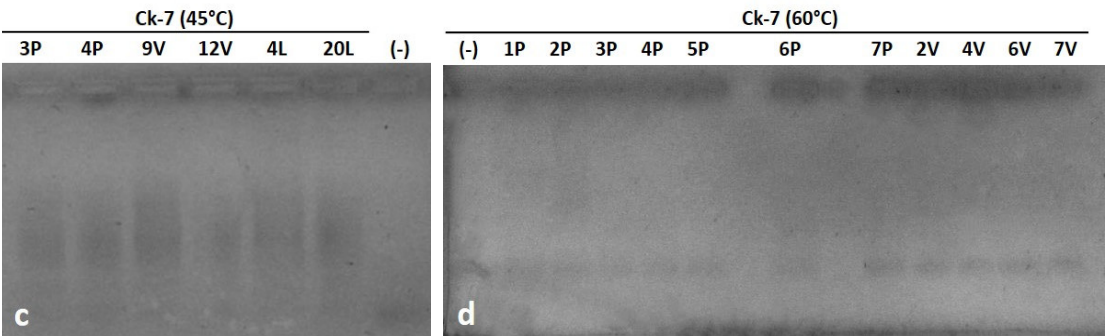


Figura 5. Productos de PCR (Gh5, Am2B-1 y Ck-7) a diferentes temperaturas de annealing, corridos en geles de agarosa (2%). (a) T° annealing: 45 y 50°C; (b) T° annealing: 55 y 60°C; (c, d) T° annealing: 45 y 60°C.

6.1.3 Act-2, MHCII, Cam-4

La amplificación del intrón 2 del gen de la actina (Act-2), el intrón 2 del gen del Complejo Mayor de Histocompatibilidad II (MHCII-2) y el intrón 4 del gen de la calmodulina (Cam-4) fueron evaluados bajo 3 temperaturas de annealing diferentes cada uno (50°, 55° y 60°C). El marcador Act-2 amplificó más eficientemente a 60°C aunque con 2 bandas; MHCII mostró bandas a 55° y 60°C, con 1 banda (mayor especificidad) a 60°C pero debido a que no se obtuvieron amplicones en muchas de las muestras, se eligió a 55°C como temperatura de alineamiento debido a que amplificó para todos los individuos probados a pesar que mostró 2 bandas en varias de las muestras. El marcador Cam-4 amplificó a 55° y 60° C, y se eligió esta última temperatura.

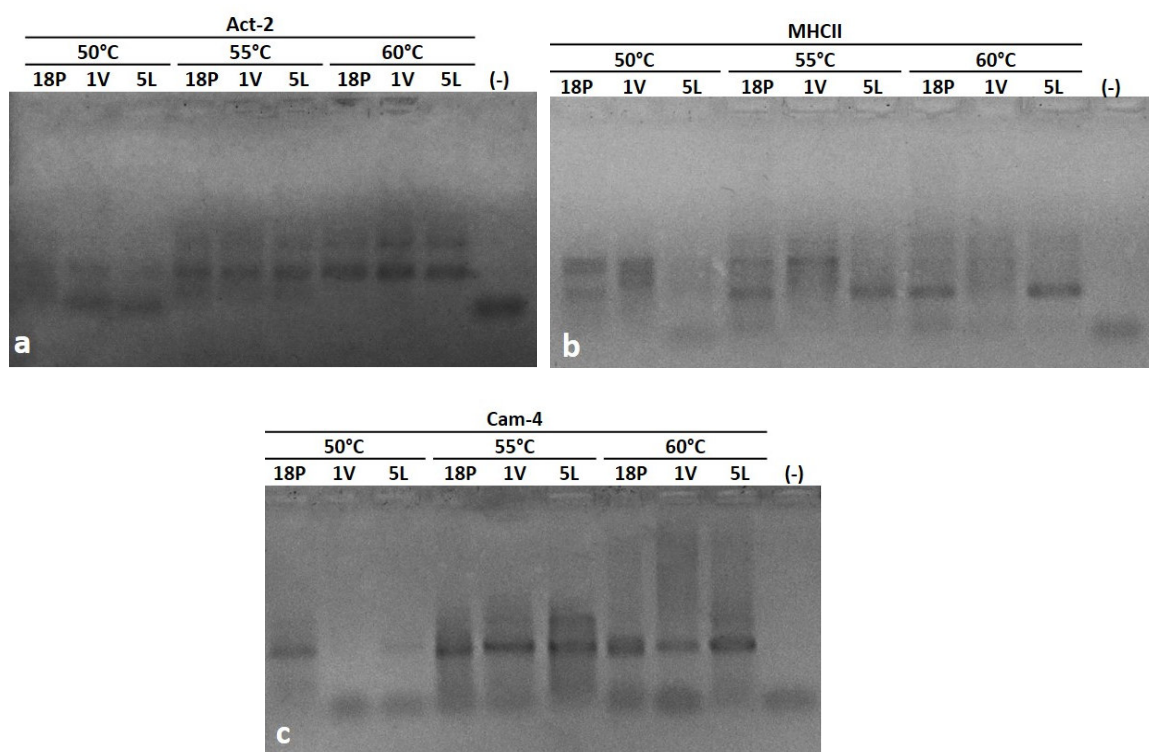


Figura 6. Productos de PCR a diferentes temperaturas de annealing (50, 55 y 60°C), corridos en geles de agarosa (2%). (a) Act-2; (b) MHCII; (c) Cam-4.

6.2 Concentración de reactivos de PCR

La amplificación de los marcadores restantes fue evaluada a diferentes concentraciones de reactivos de PCR, manteniendo las temperaturas de annealing halladas, para evitar la presencia de productos inespecíficos y mejorar especificidad de la reacción.

El marcador GnRH3-1 fue evaluado variando las concentraciones de Taq (0.75 y 1.5 U) y $MgCl_2$ (2.5; 3; 3.5 mM); amplificó para todas las muestras probadas y mostró una sola banda intensa, a 1.5 U y 3 mM respectivamente. El marcador GnRH3-2 fue evaluado bajo concentraciones de Taq (0.75 y 1.5 U) y $MgCl_2$ (2.5 y 3 mM); presentó 1 sola banda y más intensa, que bajo las otras condiciones, a 0.75 U de Taq y 2.5 mM de $MgCl_2$. Las condiciones no astringentes dadas en un inicio para todos los marcadores dieron

productos de la amplificación específicos para el marcador GnRh3-3, por lo que se mantuvo esa condición.

El marcador Am2B-1 fue evaluado a diferentes concentraciones de dNTPs (0.02, 0.05 y 0.08 mM) y dio 1 sola banda a 0.05 y 0.08 mM, que fue más intensa con la última condición. Las pruebas de MgCl_2 (2 y 2.5 mM) con el marcador Am2B-3 no mejoraron la intensidad de las bandas de los productos; por otro lado, el control negativo presentó una mancha muy tenue en algunas de las pruebas y repeticiones con este marcador.

El marcador Act-2, que presentó 2 bandas en las pruebas de temperatura, fue probado variando concentraciones de MgCl_2 (1.5, 2, 2.5 mM), dNTPs (0.03, 0.05, 0.06, 0.08 mM) y primers (0.06, 0.09, 0.12 μM); no se pudo amplificar solo 1 banda pero se obtuvo una reducción en la intensidad de la segunda banda (de posición superior) bajo las siguientes condiciones: $[\text{MgCl}_2]$: 1.5 mM; $[\text{dNTPs}]$: 0.03 mM; $[\text{primers}]$: 0.12 μM (condiciones astringentes).

Las condiciones dadas inicialmente (no astringentes) para MHC, en las pruebas de temperatura de annealing, se mantuvieron debido a que mostraron bandas intensas. El marcador Cam-4, que amplificó a condiciones no astringentes durante las pruebas de annealing, no presentó cambios cuando se varió la concentración de dNTPs (0.03 y 0.08 mM) y se mantuvo la concentración a 0.08 mM (no astringente).

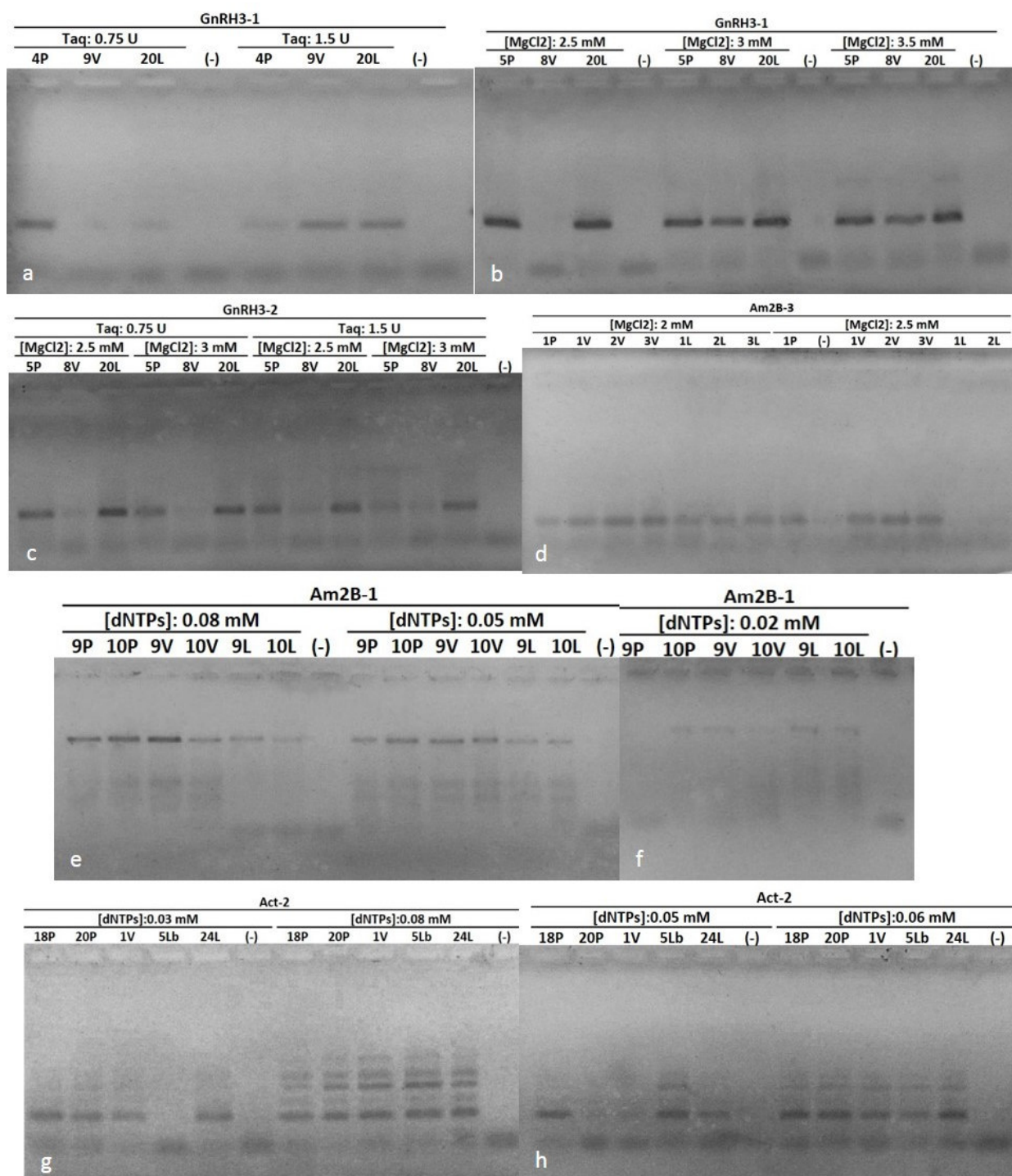


Figura 7. Electroforesis en geles de agarosa (2%) de amplicones obtenidos en la estandarización de reactivos de PCR. (a y b) GnRH3-1, pruebas de Taq(a) y MgCl₂(b); (c) GnRH3-2, pruebas de Taq y MgCl₂; (d) Am2B-3, pruebas de MgCl₂; (e, f) Am2B-1, variación de dNTPs; (g, h) Act-2, pruebas de dNTPs.

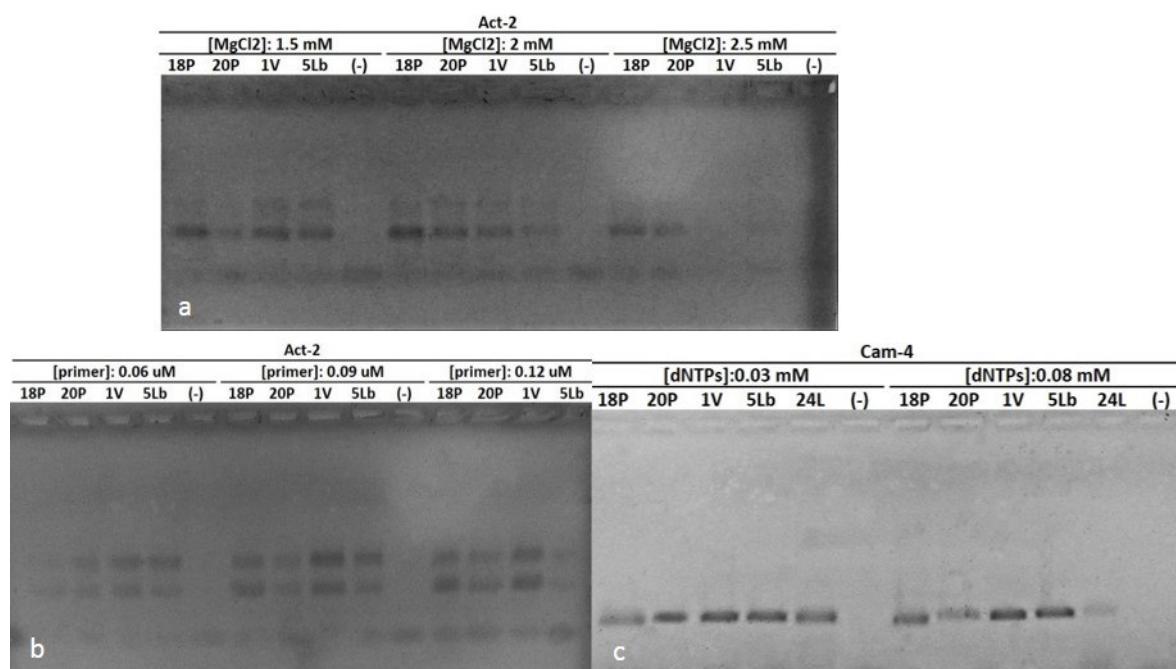


Figura 8. Electroforesis en geles de agarosa (2%) de amplicones obtenidos en la estandarización de reactivos de PCR. (a) Act-2, pruebas de MgCl₂ y (b) pruebas de primers; (c) Cam-4, pruebas de dNTPs

Tabla 6. Pruebas de la temperatura de annealing para los 10 marcadores intrónicos en caballa, *Scorber japonicus*.

Temperatura de annealing	Ck7	Gh5	GnRH3-1	GnRH3-2	GnRH3-3	Am2B-1	Am2B-3	Act-2	MHCII	CaM-4
45° C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50° C	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-
55° C	-	-	+	(+)	+	-	(+)	(+)	+	+
60° C	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
Condición final	No	No	55° C	60° C	60° C	48° C	60° C	60° C	55° C	60° C

+,Amplificación con una o más bandas. -, Prueba de amplificación probada, sin bandas. (+), Amplificación con bandas tenues.

Tabla 7. Condiciones finales de estandarización de los 8 marcadores intrónicos evaluados en temperatura de annealing y reactivos de PCR.

Reactivos y variables	GnRH3-1	GnRH3-2	GnRH3-3	Am2B-1	Am2B-3	Act-2	MHCII	CaM-4
Temperatura de annealing (°C)	55	60	60	48	60	60	55	60
MgCl ₂	3 mM	2.5 mM	2.5mM	2.5 mM	2mM	1.5mM	2.5mM	2.5mM
dNTPs	0.08 mM	0.08 mM	0.08 mM	0.05 y 0.08mM	0.08 mM	0.03mM	0.08 mM	0.08 mM
Primer (Forward)	0.12 uM	0.12 uM	0.12 uM	0.12 uM	0.12 uM	0.12uM	0.12 uM	0.12 uM
Primer (Reverse)	0.12 uM	0.12 uM	0.12 uM	0.12 uM	0.12 uM	0.12uM	0.12 uM	0.12 uM
Taq Polimerasa	1.5 U	0.75U	1.5U	1.5U	1.5U	1.5U	1.5U	1.5U

6.3 Evaluación de marcadores

Los amplicones de los 8 marcadores fueron corridos en geles de poliacrilamida (6%), de diferentes dimensiones, y teñidos en nitrato de plata para determinar el grado de polimorfismo de los marcadores. El voltaje y tiempo de corrida aplicado a la electroforesis dependieron de cada marcador.

Los geles de poliacrilamida permitieron reconocer 19 alelos en total, en los 8 marcadores probados, que presentaron desde 1 alelo (marcadores monomórficos) hasta 7 alelos (polimórfico) en el caso de Cam-4. **Figura 12.**

6.3.1 GnRH3-1, GnRH3-2 y GnRH3-3

Los marcadores GnRH3-1 y GnRH3-2 presentaron un solo alelo para los individuos provenientes de las 3 zonas (marcadores monomórficos). Las electroforesis en GnRH3-1 y GnRH3-2 fueron en geles de 20x20 cm a 500 V, con un tiempo de 4h (en GnRH3-1) y 3h 15 min (en GnRH3-2). El marcador GnRH3-3 mostró 2 alelos, con el primer alelo en todos los individuos evaluados y el segundo alelo, solo en el individuo 25V, que fue ligeramente más pesado. Las electroforesis en GnRH3-3 fueron hechas en geles de 20x20 cm a 500 V por 3 h. **Figura 9a - c.**

6.3.2 Am2B-1 y Am2B-3

El marcador Am2B-1 presentó 2 alelos, con el primer alelo en todos los individuos evaluados y el segundo alelo, perteneciente al individuo 9L, en posición superior. Las electroforesis en Am2B-1 se hicieron en geles de 20x30 cm a 500 V por 2 h 30 min. **Figura 9d.** El marcador Am2B-3 mostró por lo menos 3 alelos presentes entre las 3 zonas; sin embargo, no fue posible su genotipificación debido a una definición reducida

de las bandas. Las repeticiones y el uso de geles de mayor densidad (8%) no mejoraron la resolución. Las electroforesis en Am2B-3 fueron hechas en geles de 20x30 cm a 500 V por 1 h 50 min. **Figura 10a.**

6.3.3 Act2, MHCII y Cam4

El marcador Act-2 presenta 2 bandas con una ligera diferencia de pesos entre ellas que está en todos los individuos evaluados. Otro locus fue mostrado en posición superior aunque fue más tenue (que fue la banda que se intentó reducir con la estandarización). Los geles de poliacrilamida en Act-2 fueron de 20x20 cm a 500 V por 4 h 30 min y solo tuvo 1 alelo. **Figura 10b.**

El marcador MHC mostró 2 alelos, con el primer alelo en todos los individuos evaluados y el segundo alelo solo en el individuo 22P. Otro locus (de posición superior) fue amplificado en algunos de los individuos pero no mostró variabilidad. Los geles de poliacrilamida en MHC fueron de 20x20 cm a 500 V por 3 h 40 min. **Figura 10c.** El marcador Cam-4 presentó 7 alelos entre las 3 zonas. Los geles de poliacrilamida en este marcador fueron hechos en geles de 20x20 cm a 500 V por 5 h. **Figura 11.**

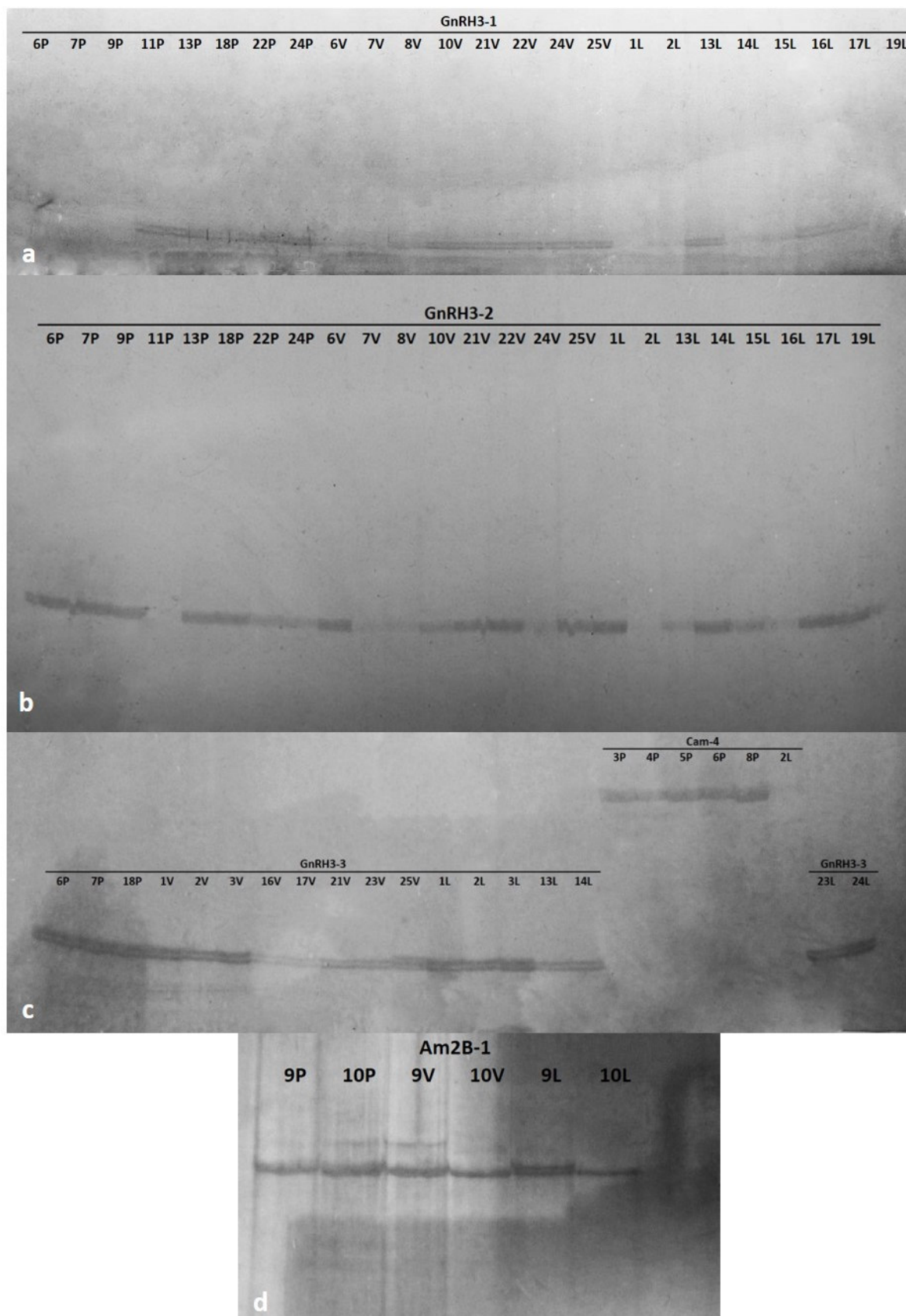


Figura 9. Geles de poliacrilamida (6%) en tinción en plata de amplicones de marcadores intrónicos (I parte). (9a) GnRH3-1; (9b) GnRH3-2; (9c) GnRH3-3 y Cam-4; (9d) Am2B-1.

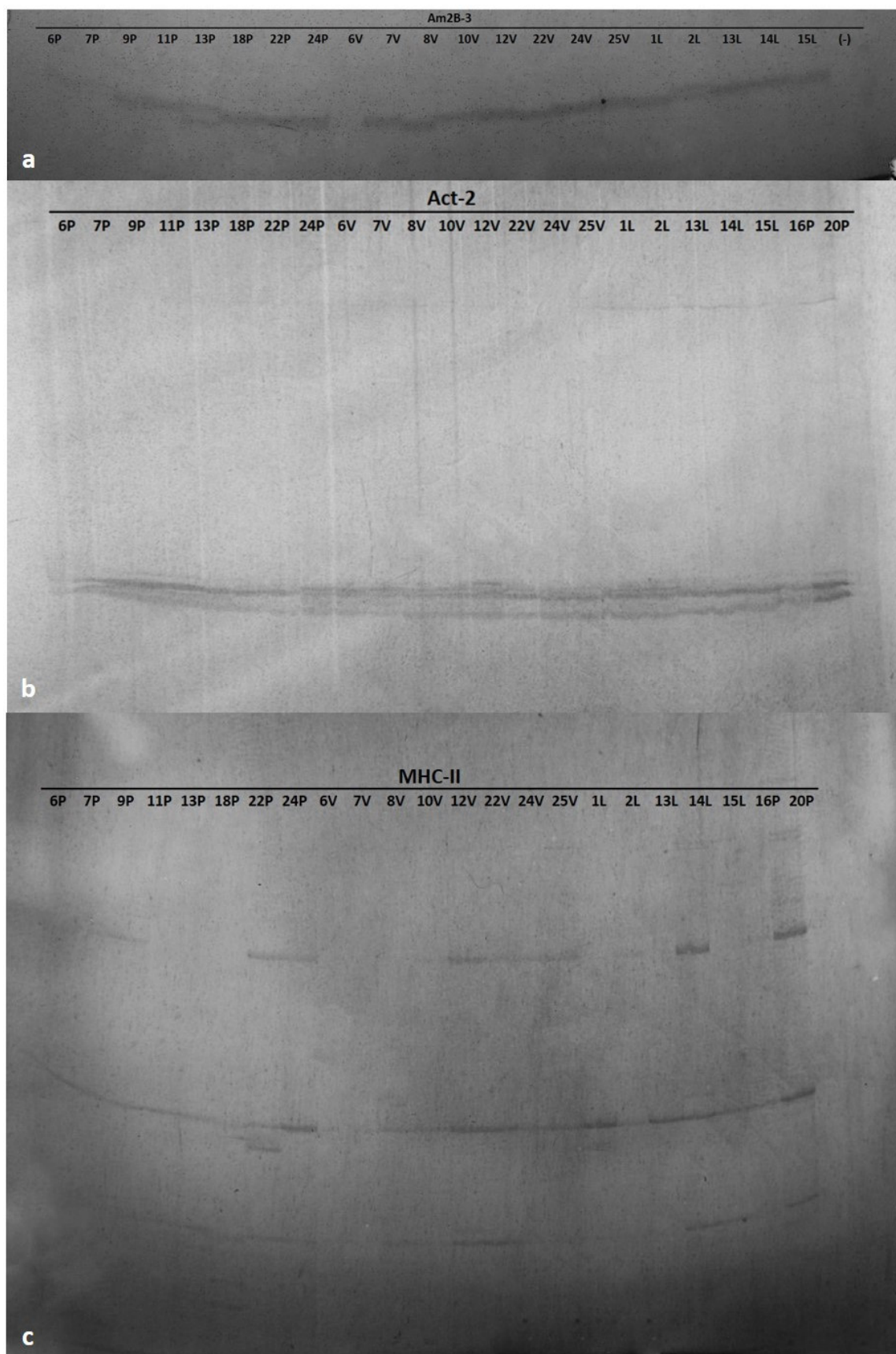


Figura 10. Geles de poliacrilamida (6%) en tinción en plata con amplicones de marcadores intrónicos (II parte). (10a) Am2B-3; (10b) Act-2; (10c) MHCII.

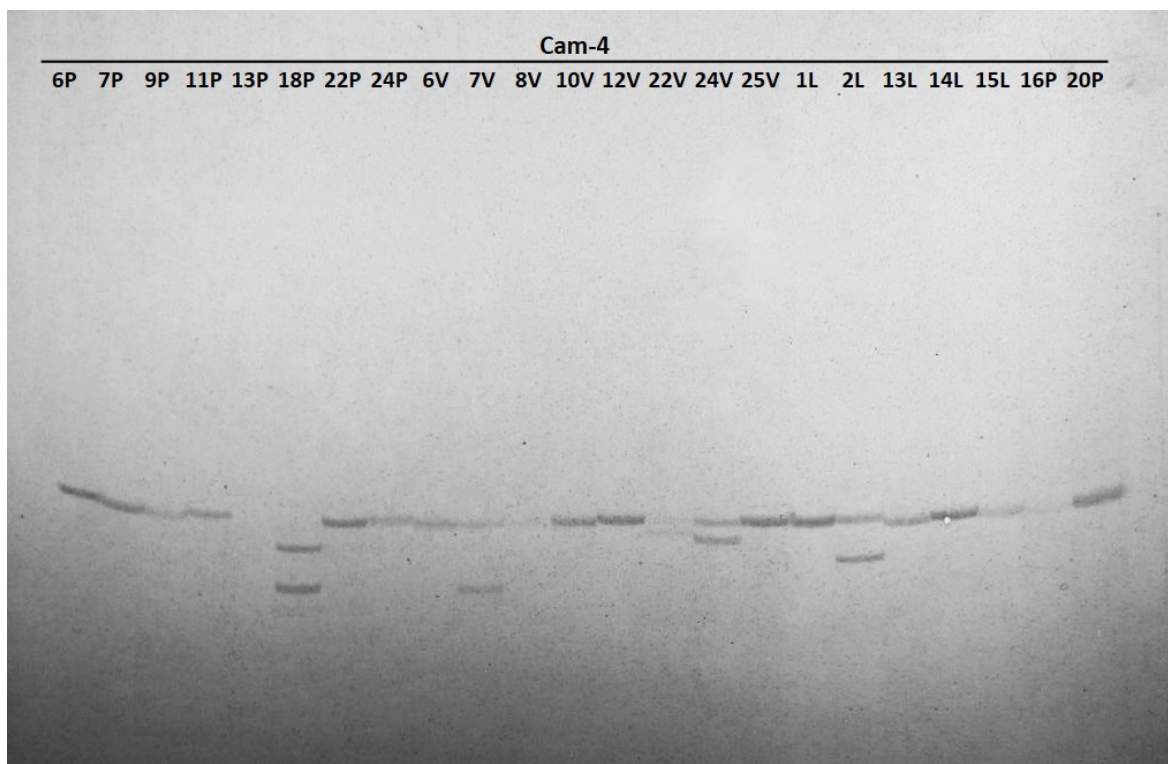


Figura 11. Gel de poliacrilamida (6%) en tinción en plata con amplicones de marcadores intrónicos (III parte). Amplicones de Cam-4.

Las corridas de geles de poliacrilamida hicieron evidente algunos artefactos en los marcadores Act-2 y MHC-II; que fueron reducidos en intensidad con las pruebas de estandarización (**Figura 10b y c**). Se representan en la Figura 12 como una banda gris y azul en Act-2 y MHC-II respectivamente.

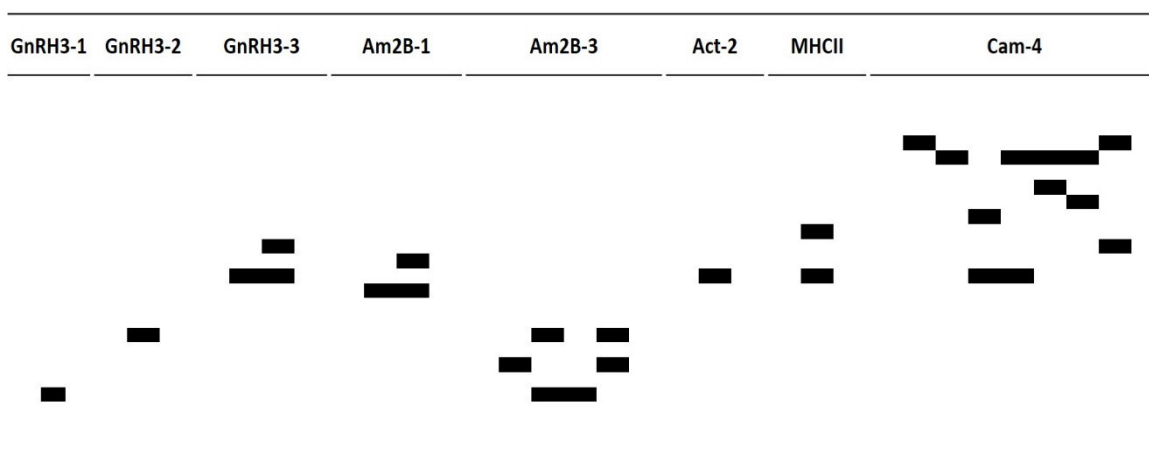


Figura 12. Representación gráfica de los alelos encontrados mediante geles de poliacrilamida (6%) en los 8 marcadores intrónicos.

6.4 Genotipificación y Caracterización molecular del marcador Cam-4

El marcador Cam-4 fue evaluado en 42 individuos de las 3 zonas (norte, centro y sur), se reconocieron 7 genotipos y 7 alelos distintos. El genotipo 1 (código 0101) fue el más común, presente en 28 individuos, seguido del genotipo 7 (código 0606) en 9 individuos; que representan el 67% y 21% del total de muestras evaluadas respectivamente.

El alelo más común fue 01 que se encontró en el 71.8% de las muestras y en 5 de los 7 genotipos, como homocigoto y heterocigoto, seguido del alelo 06 presente en el 20.8% de las muestras totales analizadas. **Tabla 8 y Figura 14.**

Tabla 8. Frecuencias genotípicas (tabla a) y alélicas (tabla b) del marcador Cam-4 en caballa, *Scomber japonicus*, en el mar peruano.

a				b	
Total	Genotipo	Individuos	Frecuencia genotípica	Alelos	Frecuencia alélica
Genotipo 1	0101	28	0.67	01	0.718
Genotipo 2	0102	1	0.02	02	0.011
Genotipo 3	0103	1	0.02	03	0.025
Genotipo 4	0105	1	0.02	04	0.012
Genotipo 5	0107	1	0.02	05	0.013
Genotipo 6	0304	1	0.02	06	0.208
Genotipo 7	0606	9	0.21	07	0.013
		42	1	Total	1

Las frecuencias genotípicas y alélicas para cada zona muestran al genotipo 1 (código 0101) predominante seguido del genotipo 7 (código 0606), en las 3 zonas (norte, centro y sur). Las frecuencias alélicas ubicaron a los alelos 01 y 06 como los alelos presentes en la mayoría de los individuos muestreados. **Tabla 9 y Tabla 10.**

Tabla 9. Frecuencias genotípicas y alélicas del marcador Cam-4 en caballa, *Scomber japonicus*, en la zona norte (Paita), zona centro (Ventanilla) y zona sur (Ilo).

Zona	N° Genotipo	Genotipo	Individuos	Frecuencia genotípica
Norte (Paita)	1	0101	10	0.71
	6	0304	1	0.07
	7	0606	3	0.21
			14	1
Centro (Ventanilla)	1	0101	9	0.69
	3	0103	1	0.08
	4	0105	1	0.08
	5	0107	1	0.08
	7	0606	1	0.08
			13	1
Sur (Ilo)	1	0101	9	0.6
	2	0102	1	0.07
	7	0606	5	0.33
			15	1

Tabla 10. Frecuencias alélicas del marcador Cam-4 en caballa, *Scomber japonicus*, en la zona norte (Paita), zona centro (Ventanilla) y zona sur (Ilo).

Zona	Alelo	Conteo	Frecuencia alélica
Norte (Paita)	01	20	0.714
	03	1	0.036
	04	1	0.036
	06	6	0.214
		28	1
Centro (Ventanilla)	01	21	0.808
	03	1	0.038
	05	1	0.038
	06	2	0.077
	07	1	0.038
		26	1
Sur (Ilo)	01	19	0.633
	02	1	0.033
	06	10	0.333
		30	1

Algunos alelos se presentaron en una determinada localidad, alelos privados, con una baja frecuencia. El alelo 02 estuvo presente solo en Ilo (0.033%), el alelo 04 solo en Paita (0.036%) y los alelos 05 (0.038%) y 07 (0.038%) estuvieron solo en Ventanilla.

Figura 13 y Figura 14.

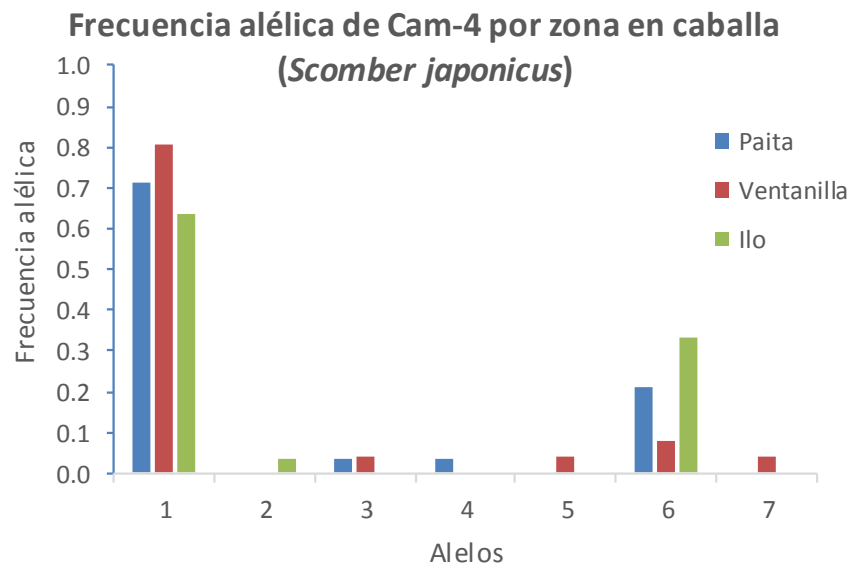


Figura 13. Gráfica de frecuencia alélica de Cam-4 de la caballa, *Scomber japonicus*, por zonas.

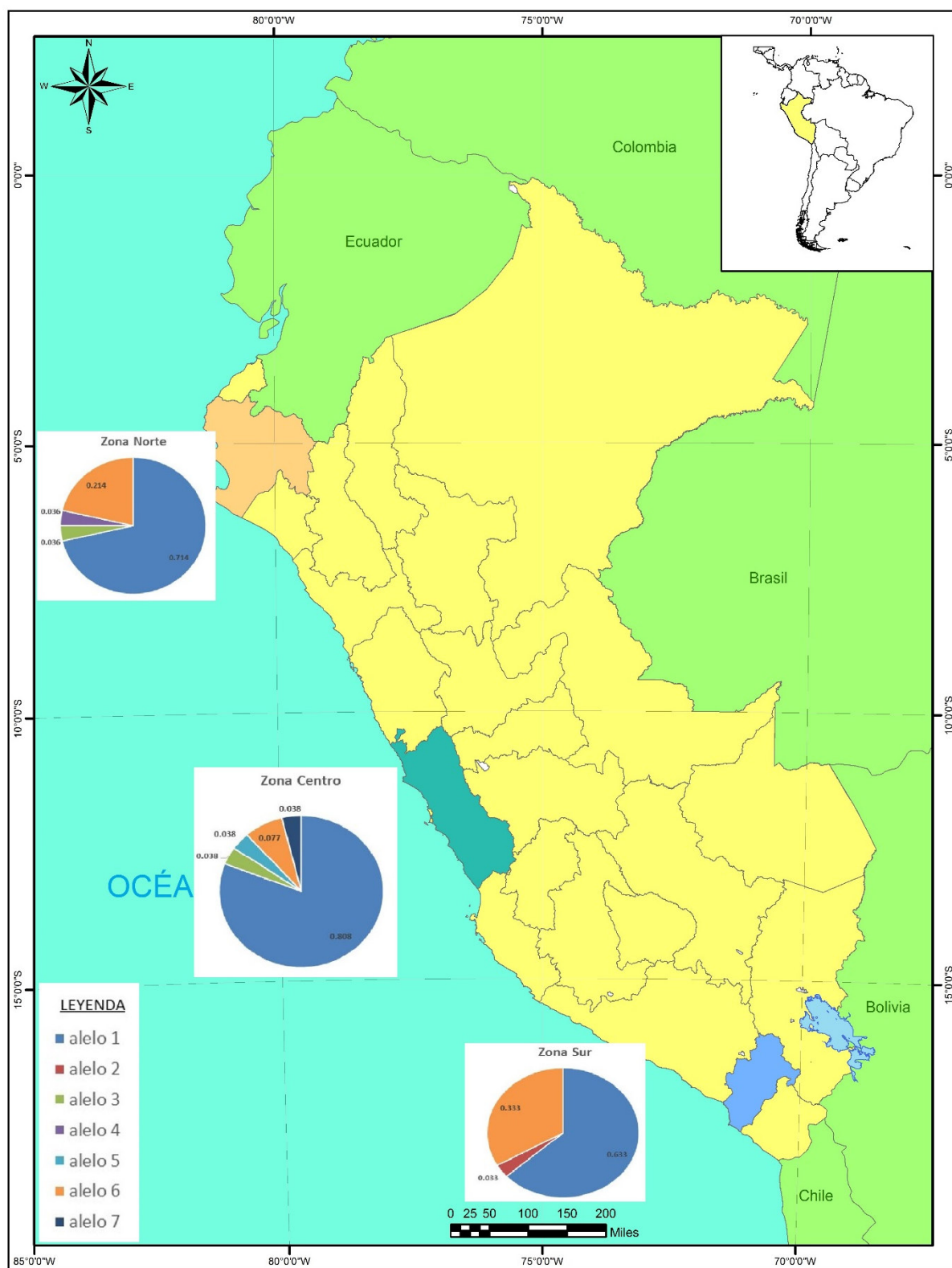


Figura 14. Mapa de distribución de alelos del marcador Cam-4 en la caballa, *Scomber japonicus*, en el mar peruano.

Tabla 11. Estimados de la diversidad genética del marcador Cam-4 en la caballa, *Scomber japonicus*, en el mar peruano y programas empleados.

	Paita	Ventanilla	Ilo	Total	Programas empleados
Número de individuos (N)	14	13	15	42	
Número de alelos	4	5	3	7	
Riqueza alélica (AR)	3.857	5	2.867	3.763	Fstat
Índice de endogamia (Fis)	0.849	0.351	0.872	0.69	
Número de heterocigotos	1	3	1	5	
Número de homocigotos	13	10	14	37	
Número de alelos privados	1	2	1	4	
Número efectivo de alelos (Ne)	1.790	1.509	1.948	1.749	
Heterocigosidad observada (Ho)	0.071	0.231	0.067	0.123	GenALEX
Heterocigosidad esperada (He)	0.441	0.337	0.487	0.422	
Heterocigosidad esperada corregida (uHe)	0.458	0.351	0.503	0.437	
Test de desviación de Hardy Weinberg - HWE (p-value)	0.00001	0.16864	0.00012		ARLEQUIN
Contenido de Información Polimórfica (PIC)	0.3916	0.3237	0.3964	0.395	CERVUS
Estimado de frecuencia de alelos nulos	0.7451	0.1691	0.7643	0.5911	

Los extremos del rango poblacional Paita e Ilo muestran elevados coeficientes de endogamia (0.849 y 0.872 respectivamente), desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg ($p\text{-value} = 0.00001$ y $p\text{-value} = 0.00012$) hacia un déficit de heterocigotos y una alta frecuencia de alelos nulos. En cambio Ventanilla, población central, posee un bajo coeficiente de endogamia (0.351), se halla en equilibrio de Hardy-Weinberg y una relativa baja frecuencia de alelos nulos **Tabla 11**

7 DISCUSIÓN

7.1 Estandarización de PCR

Los ensayos de estandarización de marcadores relacionados a temperatura de annealing con cantidades de reactivos en exceso resultaron en la amplificación de 8 de los 10 marcadores iniciales.

La mayoría de las temperaturas de annealing obtenidas experimentalmente fueron distintas de las reportadas en otras especies (Chow, 1998, Hassan et al., 2002 y Atarhouch et al., 2003). Las temperaturas de annealing obtenidas para los marcadores GnRH3-1 (55°C), GnRH3-2 (60°C), GnRH3-3 (60°C), Am2B-3 (60°C) permitieron la amplificación de sus regiones intrónicas, en GnRH3-1 solo amplificó bajo esa condición pero para los demás marcadores GnRH3-2, GnRH3-3 y Am2B-3 amplificaron a 55°C y 60°C como temperatura de annealing. Las mayores temperaturas con productos de PCR (60°C) fueron conservadas debido a que mayores temperaturas de annealing permiten mayor especificidad en las reacciones de PCR (Sipos et al., 2007), además de mostrar mayor intensidad de las bandas en los geles de agarosa que la otra condición (55°C).

Los marcadores Gh-5 y Ck-7 no amplificaron bajo ninguna de las condiciones probadas. El marcador Gh-5 fue probado a 4 temperaturas de annealing (45, 50, 55 y 60°C), temperaturas reportadas con amplificación en otras especies, y Ck-7 fue probado bajo la misma temperatura de annealing (45°C) con la que amplificó en el “atún de ojo grande”, *Thunnus obesus* (Hassan et al., 2002), pero no se obtuvieron amplicones. Posibles mutaciones en las regiones de alineamiento de los primers en las cadenas de ADN podrían ser los causantes de la ausencia de productos de PCR. El marcador Am2B-1, en cambio, amplificó pero solo a 50°C de temperatura de annealing, valor muy cercano al que se obtuvo cuando se usó en *Thunnus obesus*. Este marcador también fue probado en otras especies como “sigano jaspeado” (*Siganus rivulatus*) o la “perca

del Nilo" (*Lates niloticus*) pero se obtuvieron valores diferentes en las temperaturas de annealing (59° y 52° respectivamente) que amplificaron correctamente (Hassan et al., 2002).

7.2 Presencia de pseudogenes

Los marcadores Act-2 y MHC-II fueron evaluados con distintas temperaturas de annealing: 50°, 55° y 60°C. Las corridas electroforéticas de Act-2 (para 55° y 60°C) presentaron 2 bandas, una intensa y otra tenue en posición superior, se tomó la de mayor temperatura (60°C) para tener mayor especificidad en la reacción de PCR. El marcador MHC-II también presentó 2 bandas bajo 55°C como temperatura de annealing y se tomó esta debido a que bajo 60°C no amplificaban para todas las muestras evaluadas.

Al respecto, la amplificación de varios loci a partir de un sistema intrónico en el PCR podría ser debido a genes copia o pseudogenes presentes. Los pseudogenes son genes que han perdido su capacidad funcional de traducirse en una proteína, debido a (1) mutaciones acumuladas en la zona promotora, (2) copias degeneradas de genes funcionales que produjeron su inactivación o (3) producto de una transcripción-reversa e inserción en el ADN parental (Balakirev & Ayala, 2003; Pink & Carter, 2013).

Los pseudogenes se han encontrado en plantas, bacterias, insectos y mamíferos, y tienden a mantener su estructura característica de exón - intrón – exón (Pink et al., 2011). La presencia de más de 1 locus amplificado en scombridos fue reportado para MHC-II; 2 loci, en *Thunnus obesus* (Hassan et al., 2002) y en Act-2, 2 loci, en *Scomber scombrus* (Atarhouch et al., 2003). Pseudogenes en las muestras de caballa podrían aportar mayor información a este estudio; sin embargo, también podrían generar dificultades de lectura debido a solapamiento en los perfiles durante la genotipificación (Atarhouch et al., 2003). Por lo tanto los marcadores con bandas adicionales siguieron

con las pruebas de estandarización de reactivos para atenuar o evitar los productos adicionales en la genotipificación posterior.

Las pruebas de estandarización relacionada a concentraciones de reactivos de PCR ($MgCl_2$, dNTPS, primers, Taq pol) ayudaron a encontrar condiciones con bandas con mayor definición y sin inespecificidades para la mayoría de marcadores. El segundo locus encontrado en el marcador Act-2 fue disminuido en intensidad pero el marcador MHCII siguió presentando el 2do locus para algunas de las muestras amplificadas. En los estudios relacionados a pruebas de marcadores nuevos en varias especies, es notable apreciar que una fracción de los marcadores no amplifican; de la fracción que amplifica algunos son monomórficos (no informativos), mientras que los otros presentan más de 1 alelo, siendo dimórficos o polimórficos; otros pueden presentar más de 1 locus amplificado, multilocus (Hassan et al., 2002; Atarhouch et al., 2003). En el presente estudio, se llegaron a estandarizar las reacciones de amplificación de 8 de 10 marcadores intrónicos con excepción de Gh-5 y Ck-7.

7.3 Genotipificación de los marcadores intrónicos

Los marcadores EPIC han sido usados en peces marinos (Borsa et al., 2012; Vasconcellos et al., 2015), de agua dulce (Carvajal, 2004; Barreta, 2004; Aliaga, 2004) e invertebrados (Behere et al., 2013; Gérard et al., 2013; Chow et al., 2015). Otros marcadores usados son los marcadores mitocondriales poseen una tasa de mutación mayor que la de los nucleares (Caccone et al., 2004) y son muy usados en estudios de diferenciación genética; han sido usados en la caballa, empleando el citocromo b (Zhu et al., 2014) y con la región control (Zardoya et al., 2004). Sin embargo, se han visto diferencias en los resultados obtenidos entre los marcadores mitocondriales y los marcadores nucleares (Palumbi y Baker, 1994), y esto puede ser debido a que los marcadores mitocondriales solo conservan la información materna lo que podría otorgar

un sesgo ligado al género en las muestras de la población. En cambio, los marcadores nucleares mantienen la información de ambas líneas parentales con lo que se dispone de mayor información, dentro de este tipo de marcadores nucleares se encuentran los intrónicos que han demostrado proveer información alélica de alta resolución comparable a los estudios en ADN mitocondrial.

La genotipificación de los 8 marcadores intrónicos resultó en 19 alelos totales reconocidos. Los marcadores GnRH3-1 y GnRH3-2 tuvieron solo 1 alelo al igual que Act-2 (marcadores monomórficos), con esta falta de variabilidad no fueron informativos y se descartaron para posibles estudios de genética poblacional en la caballa *Scomber japonicus* en el área geográfica de estudio.

Los marcadores GnRH3-3, Am2B-1 y MHCII mostraron 2 alelos cada uno (dimórficos), el marcador Am2B-3 mostró 3 alelos; sin embargo, estos tampoco fueron considerados informativos debido a que la mayoría de los individuos tenían un genotipo de 1 solo alelo (individuos homocigotos) dejando a unos pocos individuos con el resto de alelos poco representados. El marcador Am2B-3 tuvo una mayor variabilidad entre los individuos genotipados que los marcadores anteriores; sin embargo, las bandas eran borrosas y aunque se hicieron corridas verticales a una mayor concentración de poliacrilamida (cambió de 6% a 8%) para aumentar la resolución de estas, el resultado no varió y tampoco fue considerado para las evaluaciones de diversidad genética.

Algunos autores evaluaron la amplificación de primers EPIC-PCR en muestras de diferentes grupos taxonómicos (Bierne et al., 2000; Hassan et al., 2002; Gérard et al., 2013; Chow et al., 2015) obteniendo resultados positivos en gran parte de ellos; respecto al número de loci que resultaron polimórficos, obtuvieron entre 21 y 40.7% del total evaluado (Hassan et al., 2002; Atarhouch et al., 2003), considerando como loci polimórficos a los que presentan de 2 a más alelos distintos. Si tomamos en cuenta esto, en el presente estudio tendríamos 5 marcadores con más de 2 alelos, aunque la mayoría

de estos no serían informativos debido a la baja representatividad de algunos alelos, obteniendo finalmente un marcador polimórfico e informativo (Cam-4).

7.4 Caracterización del marcador Cam-4

El marcador Cam-4 mostró 7 alelos en 42 individuos de las 3 zonas (norte, centro y sur) y fue el único de los 8 marcadores que fue empleado en las pruebas de caracterización (**Figura 12**). Los marcadores EPIC han sido empleados en estudios de genética poblacional en otras especies como sardina, para Cam-4, donde se encontraron 6 alelos en un total de 346 individuos del Océano Atlántico y el Mar Mediterráneo (Atarhouch et al., 2007) y 7 alelos en *Sicyopterus lagocephalus* en el Océano Índico (Hoareau et al., 2007). En el presente estudio los genotipos reconocidos fueron 7 en total en toda la población, con el genotipo 1 (código 0101) y el genotipo 7 (código 0606) como los más frecuentes que representaron el 67% y 21% de todos los individuos evaluados respectivamente. De similar forma, los alelos más frecuentes fueron el alelo 01 y 06 con 71.8% y 20.8% de los individuos evaluados respectivamente, esto dejó a los demás alelos poco representados.

La heterocigosis observada (H_o) y esperada (H_e) en caballa en este estudio fue de 0.123 y 0.422 respectivamente; en otras evaluaciones con marcadores intrónicos, en sardina fueron de 0.51 y 0.67 respectivamente (Atarhouch et al., 2007), en *Sicyopterus lagocephalus* de 0.455 y 0.527 respectivamente (Hoareau et al., 2007), en atún de 0.521 y 0.488 respectivamente (Chow y Nakadate, 2004) y en la corvinilla fue de 0.376 y 0.503 respectivamente (Vasconcellos et al., 2015); considerándose todos estos casos como valores moderados de heterocigosidad, aunque en algunos casos fue suficiente para determinar una diferenciación entre subpoblaciones (Atarhouch et al., 2007; Borsa et al., 2012 ; Vasconcellos et al., 2015).

Tabla 12. Valores de heterocigocidad observada (Ho) y esperada (He) empleando marcadores intrónicos en otras especies.

Nombre común	Especie	Ho	He	Estudio
Sardina	<i>Sardina pilchardus</i>	0.51	0.367	Atarhouch et al., 2007
Corvinilla	<i>Sicyopterus lagocephalus</i>	0.455	0.527	Hoareau et al., 2007
Atún	<i>Thunnus alalunga</i>	0.521	0.488	Chow y Nakadate, 2004
Corvinilla	<i>Micropogonias furnieri</i>	0.376	0.503	Vasconcellos et al., 2015
Pez espada	<i>Xiphias gladius</i>	0.388	0.408	Chow, 1998
Caballa	<i>Scomber japonicus</i>	0.123	0.422	Presente estudio, 2017

Los resultados de este estudio muestran que la heterocigosidad esperada es significativamente mayor a la heterocigosidad observada, y esta diferencia es la mayor reportada con respecto a trabajos con intrones en otras especies, comportamiento similar se ha observado en la corvinilla. **Tabla 12.** Los valores de PIC para Cam-4 son considerados como intermedios a pesar de tener 7 alelos diferentes, esto podría ser debido a la baja frecuencia de varios de ellos, considerando que la estimación del valor PIC es influenciada por el número y frecuencias de los alelos.

Las poblaciones de Paita y Ventanilla presentan desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg, debido a un déficit de heterocigotos. A diferencia de la población central de Ventanilla que se halla en equilibrio. Varios autores han encontrado déficit de heterocigotos en estudios en diversidad genética y estructura poblacional (García De León et al., 1997; Gutierrez-Rodriguez & Lasker, 2005; Tripp, 2009 Paredes, 2013; Berdugo & Narvaez, 2014; Tang et al., 2016).

7.5 Déficit de heterocigotos.

Estos déficits de heterocigosidad pueden ser atribuidos principalmente al efecto Wahlund y/o endogamia (Gutierrez-Rodriguez & Lasker, 2005), seguidos de la selección natural, alelos nulos, cruzamiento no aleatorio; aunque, determinar la causa del déficit de heterocigotos en la población puede ser prácticamente imposible y podría incluso

tener una explicación combinada con las alternativas mencionadas (García De León et al., 1997; Sanches, 2007). Ha sido detectado en intrones de moluscos (Arias et al., 2009)

En el caso del **efecto Wahlund**, este déficit de heterocigotos se debería a la presencia de subpoblaciones con diferencias en sus frecuencias alélicas debido al efecto de la deriva y el flujo génico, es así que aunque las subpoblaciones estén en equilibrio HW, se evidenciaría desequilibrio de HW en la población total. Las causas que explicarían este fenómeno serían la dispersión de los individuos en una extensa área geográfica o la presencia de una barrera física o ecológica que limitaría el flujo génico (Wahlund 1928, Garnier-Géré & Chikhi, 2013). Sin embargo, si consideramos la aparente ausencia de barreras geográficas en el ambiente marino, el potencial de dispersión y el flujo génico de las poblaciones de peces marinos (Palumbi, 1994); y las características hidrodinámicas propias de especies pelágicas, como la caballa, con alta dispersión de adultos que facilita el flujo génico entre poblaciones y que hace poco probable al efecto Wahlund. Cabe señalar que algunos estudios demuestran que barreras físicas marinas como fuertes corrientes oceánicas y giros condujeron a una fragmentación intraespecífica en algunas especies de peces (Zardoya et al., 2004) y se tendría que demostrar la presencia de estas barreras en este caso. Además solo una de tres poblaciones se halla en equilibrio. Por lo que este efecto no podría ser el responsable de la desviación observada.

El **apareamiento no aleatorio** puede ser otra razón para la desviación del equilibrio de Hardy Weinberg (HWE). Se asume que los individuos en una población presentan un apareamiento al azar; la mayoría tiende a aparearse entre individuos cercanos geográficamente (Garnier-Géré & Chikhi, 2013); la endogamia es otra posible causa del déficit de heterocigotos, reduciendo la supervivencia, la resistencia ambiental y la fertilidad de la descendencia de organismos relacionados (Keller & Waller, 2002; Charlesworth & Willis, 2009). La endogamia y la pérdida de diversidad genética reducen

la resistencia a enfermedades y toxinas en las poblaciones, como se ha visto experimentalmente en *Drosophila melanogaster* expuesta a *Serratia marcescens* y a thuringiensina, una toxina de *Bacillus thuringiensis* (Spielman et al., 2004) y ocurre en poblaciones de cualquier tamaño, pero sus efectos son más notorios en pequeñas poblaciones (Wang et al., 2002). Los índices de endogamia en las poblaciones de Paita e Ilo son muy altos y estos podrían indicar la presencia de alguna restricción al flujo génico entre ambas localidades, la distancia geográfica podría ser considerada. En una región de menor extensión al mar peruano entre el mar del Este de China y las aguas japonesas, se ha detectado dos unidades poblacionales diferentes (Cheng et al., 2015). La mayor distancia geográfica favorecería la endogamia y por lo tanto el incremento de los homocigotos en varios loci en las poblaciones distantes de Paita e Ilo.

La **selección natural** puede ser otra de las posibles causas de desviación de HWE. Se asume a priori que el marcador intrónico Cam-4 no se halla bajo selección natural, debido a que es una región nuclear no codificante y un marcador esencialmente neutral, pero no podemos descartar totalmente que la selección afecte a este tipo de marcador. Los intrones poseen secuencias señal (Harris & Senapathy, 1990), las cuales son importantes para el adecuado proceso de empalme o maduración del ARNm, así como también son elementos cercanos a una región codificante (los exones) formando parte del gen, es decir se hallan estrechamente ligados. Es decir, se hallan indirectamente sujetos a la selección del gen del cual forman parte, a este se conoce como el efecto Hill-Robertson (Barton, 2010). Adicionalmente en los modelos de selección hitchhiking se predice que regiones cercanas a sitios que experimentan selección positiva deberían albergar niveles reducidos de polimorfismo neutral (Smith & Haigh 1974). En resumen, en el caso de los EPICs la selección actúa en las regiones codificantes vecinas, favoreciendo alelos ventajosos, pero este efecto se detecta indirectamente en una disminución de la heterocigosidad de los intrones (loci neutros ligados) (Charlesworth et al., 1993)

Aunque, parece ser que el tamaño de los intrones tendría una relación con la selección en genes altamente expresados (Castillo- Davis et al., 2002) y calmodulina es un gen activo en muchas de las reacciones metabólicas, movimiento intracelular, contracción muscular, procesos inflamatorios y demás; en contraste, Fox y Wolf (2006) mencionan que la mayoría de intrones han persistido durante mucho tiempo y que los niveles de variación en la longitud de ellos es alto indicando que la longitud de los intrones podrían no estar siendo afectados por una fuerte selección. Estudios posteriores han seguido empleando marcadores EPIC-PCR (Gérard et al., 2013; Jiang et al., 2014; Yao et al., 2015; Chow & Yanagimoto, 2016).

7.6 Alelos nulos

Otra causa es que el déficit de heterocigotos se deba a artefactos técnicos, denominados alelos nulos. La incidencia de alelos nulos es común en marcadores microsatélites pero son raras cuando se emplean intrones. Esta incidencia implica una reducción de la diversidad en la detección de alelos debido a mutaciones en los lugares de unión de los primers lo que ocasiona la amplificación de solo uno de los alelos (en ocasiones ningún alelo), resultando como individuos homocigotos.

Los resultados indican que hay una alta probabilidad de presentar alelos nulos en las zonas norte (0.7451) y sur (0.7643), subestimando la cantidad de alelos presentes, con lo que se estaría obteniendo una estimación parcial de la diversidad genética en la zona de muestreo total. Pero la interpretación de alelos nulos en el caso de este tipo de marcadores es diferente, debido a que los primers son diseñados en la región codificante la cual se halla altamente conservada y se halla bajo presión de selección, si alguna mutación se produjese en esta región haría inviable al individuo al producir se una proteína anómala por lo que este tipo de mutaciones no serían muestreadas en la población debido a que serían eliminadas en las etapas tempranas del desarrollo del individuo. Si un genotipo homocigoto nulo/nulo es letal para este marcador universal (la

mutación afecta la función del gen) ellos no pueden ser detectados en la muestra. En cambio, en los microsatélites los primers se hallan en regiones no codificantes que pueden acumular mutaciones que afecten drásticamente la unión del primers pero no estarían sujetas a selección, estas mutaciones pueden fijarse en la población.

Por tal motivo la estimación de alelos nulos para intrones tiene una fundamentación e interpretación biológica distinta para la cual fue diseñada (microsatélites), los alelos nulos serían eliminados de la población en etapas tempranas de desarrollo del individuo. Aunque, una alternativa sería verificar con la actual disponibilidad de información genómica el grado de conservación de estos sitios de unión al primer y si fuera el caso diseñar primers en lugares distintos a los anteriores pero dentro de los mismos exones.

A diferencia de lo detectado con el microsatélite SJT18, marcador neutral, que se halla en las mismas localidades en equilibrio de HW y el marcador mitocondrial que revela una sola unidad poblacional (Barahona 2014). Bajo este modelo de EPICs la población de Ventanilla se halla en equilibrio HW y no presenta déficit de heterocigotos, pero contrariamente las poblaciones de Paita e Ilo se hallan en desequilibrio, esta podría ser reflejo del efecto de selección hitchhiking en el gen, o esto sería un reflejo del bajo tamaño de muestra empleado en el presente estudio, a pesar de ser esta altamente significativo.

7.7 Desembarques de caballa

Las condiciones ambientales durante los periodos de verano del 2012, 2013 y 2014 estuvieron dentro del rango normal y un ligero calentamiento a comienzos de marzo del 2014, periodo que estuvo fuera de las fechas de muestreo. La temperatura superficial del mar, la temperatura del aire y el nivel medio de mar se normalizaron en toda la costa peruana a mediados de ese año descartando la posible presencia de El Niño (ENFEN, 2012; 2013; 2014).

El recurso caballa tuvo una cuota de pesca de 48 000 t para el año 2013 (R.M. 363-2013-PRODUCE) y los desembarques industriales de caballa fueron de 33 000 t en el 2013 y 34 000 t en el 2014 aproximadamente, mientras que la pesca artesanal desembarcó 4 000 t en el 2013 y 4 600 t en el 2014 (IMARPE 2013, 2014). Los valores de desembarques de la pesquería industrial presentan valores alrededor de 30 000 - 40 000 t anuales; sin embargo, cabe señalar que se muestran desembarques alternados de cantidades que disminuyen hasta 2 000 y 6 000 t como sucedió en los años 2010, 2012 y 2015 (IMARPE 2010, 2012, 2015).

Las condiciones normales que encontramos en los factores ambientales y en los valores de desembarques de caballa, antes y durante el periodo de muestreo 2013 y 2014, sugiere no tomarlos como posibles causantes de un alto índice de endogamia, tomando en cuenta a la incidencia de alelos nulos como una probable explicación de la alta presencia de homocigotos en este estudio.

Se debe tener en cuenta que en este estudio se evaluó la diversidad genética en torno a polimorfismos de longitud (como inserciones o deleciones) en las que la variabilidad está marcada por el aumento o disminución del tamaño de los intrones. Las mutaciones como las inversiones o las mutaciones puntuales, como los SNPs, no son detectadas por las técnicas de genotipificación utilizadas en este estudio debido a que no significan un cambio en el tamaño del intrón. Estos últimos tipos de mutación se podrían detectar con técnicas de secuenciamiento y junto con las condiciones de PCR obtenidas en la estandarización en este estudio se podría obtener mayor información genética de este recurso, especialmente en los marcadores que mostraron mayor variabilidad, como los de 2 alelos (dimórficos) a más (polimórficos).

7.8 Evaluaciones genético-poblacionales en caballa

La variabilidad genética de la caballa *Scomber japonicus* ha sido evaluada empleando varios tipos de marcadores en distintas regiones. Tabla13.

Los marcadores mitocondriales son más sensibles para detectar pasados eventos de deriva génica en comparación a los microsatélites. A su vez estiman en el caso de *Scomber japonicus* una mayor diversidad que los microsatelites y los intrones. A nivel de estructuración poblacional, los microsatélites tienen una capacidad resolutive más fina que los marcadores mitocondriales, principalmente por el tipo de herencia (biparental y matrilineal, respectivamente), además que en las secuencias del marcador mitocondrial un locus (un sitio del alineamiento es bialélico) pero que un microsatélite es multialélico y el poder de estos últimos es mayor a medida que incrementa su número. También hay que considerar la diferente tasa de mutación de los marcadores empleados, entre los cuales los intrones poseen la menor, pero ofrecen la ventaja de detectar y discutir el efecto de Hill-Robertson que mediante el hitchhiking permite detectar indirectamente posibles efectos de la selección en el marcador.

Tabla 13. Estudios empleando marcadores mitocondriales y nucleares en caballa *Scomber japonicus*.

Tipo de marcador	Marcador	He	Ubicación	Referencia
Mitocondrial	Región control	0.98 - 1	Mar Mediterráneo y Océano Atlántico	Zardoya et al., 2004
Mitocondrial	Citocromo b	0.51 - 0.97	China	Zhu et al., 2014
Nuclear	Microsatélites	0.68 - 0.81	China	Cheng et al., 2014
Nuclear	Microsatélites	0.452 - 0.701	China	Cheng et al., 2015
Mitocondrial	Región control	0.72 - 0.96	Perú	Barahona 2014
Nuclear	Microsatélite	0.35 - 0.53	Perú	Barahona 2014
Nuclear	Intrónico	0.34 - 0.49	Perú	Presente estudio

Otro punto importante son las características del ambiente donde se habitan las poblaciones de caballa. Los ambientes donde se encuentran las poblaciones del Mar Mediterráneo y del Mar de China presentan islas, giros (como en el Mar Adriático) y

extensiones de costa que podrían significar una limitación en torno a la movilidad. A diferencia del mar peruano donde la única formación geográfica considerable es la Dorsal de Nazca que debido a su profundidad (2000-3000m) no representa una barrera geográfica propiamente dicha que restrinja el flujo del recurso en la zona, aún así la población de caballa en nuestro mar presenta diversidad elevada usando la región control (Barahona, 2014).

Los valores de diversidad obtenidos por Barahona (2014) usando el microsatélite SJT18 (11 alelos) son considerados intermedios en diversidad y cercanos a los obtenidos en este estudio empleando Cam-4 (7 alelos), aún cuando el primero obtuvo más alelos. Estos como todos los marcadores presentan pros y contras, en el caso de los microsatélites el efecto stuttering, característico de su variabilidad, significó una reducción de los marcadores a probar, junto con la probable incidencia de los alelos nulos (Hoareau et al., 2007); los intrónicos, por otro lado, no presentan el efecto stuttering como las anteriores. Sin embargo, la presencia de alelos nulos aún cuando en teoría son raros en intrones podría originar valores elevados de endogamia (F_{is}) en Cam-4.

El presente estudio es el primer trabajo en que se evalúa la diversidad genética de la caballa empleando marcadores intrónicos. Siendo necesaria mayor información de distintos marcadores: mitocondrial (como citocromo b), otros microsatélites e intrónicos polimórficos (como Am2B-3, Cam-4 y más) junto con tecnología de secuenciamiento que podrían aportar información de mayor resolución y complementar el conocimiento que se tiene del recurso caballa.

8 CONCLUSIONES

- Las condiciones finales de estandarización de PCR para 8 de 10 marcadores intrónicos fueron determinadas para caballa (GnRH3-1, GnRH3-2, GnRH3-3, Am2B-1, Am2B-3, MHCII, Act-2, y Cam-4), lo que permite disponer de las condiciones adecuadas para futuras evaluaciones genéticas empleando estos marcadores.
- El grado de polimorfismo de estos marcadores intrónicos evaluados fue: monomórficos (GnRH3-1, GnRH3-2 y Act-2), dimórficos (GnRH3-3, Am2B-1 y MHCII) y polimórficos (Am2B-3 y Cam-4). Cam-4 fue informativo para evaluar polimorfismos de longitud; sin embargo, todos estos marcadores caracterizados pueden ser empleados para evaluaciones de mayor resolución mediante técnicas de secuenciamiento.
- La diversidad genética de la población de *Scomber japonicus* en el mar peruano empleando el marcador Cam-4 fue moderada $H_e=0.422$ con significativo déficit de heterocigotos en la costa peruana especialmente en las zonas norte (Fis: 0.85) y sur (Fis: 0.87).
- Los alelos 01 y 06 estuvieron en las tres zonas con mayor frecuencia (72 y 21% respectivamente); mientras que el alelo 04 estuvo solo en la zona norte (Paíta), los alelos 05 y 07 solo en la zona centro (Ventanilla) y el alelo 02 solo en la zona sur (Ilo), representados con menor frecuencia.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEGRE A., P. ESPINOZA & M. ESPINO. 2013. Ecología trófica del jurel *Trachurus murphyi* en el Perú entre 1977-2011. En: Csirke J., R. Guevara-Carrasco & M. Espino (Eds.). Ecología, pesquería y conservación del jurel (*Trachurus murphyi*) en el Perú. Rev. peru. biol. número especial 20(1): 075- 082.
- ALEGRE N. & ANA P. 2015. Trophic ecology of jumbo squid and predatory fishes in the Northern Humboldt Current System. Tesis (PhD). Université Montpellier. Spécialité: Biologie des populations et écologie.
- ALIAGA C. 2004. Variabilidad genética de *Colossoma macropomum* y *Piaractus brachypomus* en la region del Alto Madera (Amazonia Boliviana) para el analisis del polimorfismo de la longitud de secuencias intronicas (EPIC-PCR). « Licenciatura en Biología », Institut de Biologie moléculaire et BiotechnologieIBMB - UMSA, La Paz (Bolivie).
- ALJANABI S. AND MARTINEZ I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Res.25:4692–4693.
- ALLENDORF F. 1986. Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. Zoo Biology, 5, 181–190.
- ANTEZANA, T., 2010. *Euphausia mucronata*: a keystone herbivore and prey of the Humboldt Current System. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography 57: 652–662.
- ARIAS, A., FREIRE, R., MÉNDEZ, J., & INSUA, A. 2009. Intron characterization and their potential as molecular markers for population studies in the scallops *Aequipecten opercularis* and *Mimachlamys varia*. Hereditas, 146(2), 46-57.

- ATARHOUGH T., RAMI M., CATTANEO-BERREBI G., IBANEZ C., AUGROS S., BOISSIN E., DAKKAK A. & BERREBI P. 2003. Primers for EPIC amplification of intron sequences for fish and other vertebrate population genetic studies. *Biotechniques*, 35: 676-682.
- ATARHOUGH T., RAMI M., NACIRI M. & DAKAI A. 2007. Genetic population structure of sardine (*Sardina pilchardus*) off Morocco detected with intron polymorphism (EPIC-PCR). *Marine Biology*, 150 (3): 521-528.
- AVISE, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution* (Second Edition). Sinauer, Sunderland, MA. (684 pp.).
- BACKSTRÖM N., FAGERBERG S, ELLEGREN H. 2008. Genomics of natural bird populations: a gene-based set of reference markers evenly spread across the avian genome. *Mol Ecol* 2008, 17(4): 964-980.
- BALAKIREV E., AYALA F. 2003. Pseudogenes: are they “junk” or functional DNA? *Annu Rev Genet* 37:123–151.
- BARAHONA P. 2014. Utilización de loci microsatélites y ADN mitocondrial para evaluar la estructuración genético-poblacional de la caballa (*Scomber japonicus* Houttuyn, 1782) en el mar peruano. Tesis para optar el título de biólogo Biotecnólogo. UNMSM
- BARRETA J. 2004. Variabilidad genética de *Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum* en el Alto Madera de la Amazonia Boliviana por análisis comparativo del polimorfismo de longitud de secuencia de intrones (EPIC- PCR) y electroforesis enzimática. Master en Ciencias Biológicas y Biomédicas. Institut de Biologie moléculaire et Biotechnologie; IBMB-UMSA, La Paz (Bolivie).
- BARTON N. Genetic linkage and natural selection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2010; 365(1552):2559-2569.

- BASSAM, B., CAETANO-ANOLLES G. AND GRESSHOFF P. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.* 196: 80–83.
- BASSAM B. AND GRESSHOFF P. 2007. Silver staining DNA in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, 2. 11: 2649-2654.
- BEAMISH, R.J. (ed.). 2008. Impacts of Climate and Climate Change on the Key Species in the Fisheries in the North Pacific. Sidney, British Columbia, North Pacific Marine Science Organization.
- BEHERE GT, TAY WT, RUSSELL DA, KRANTHI KR, BATTERHAM P (2013) Population genetic structure of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in India as inferred from EPCI-PCR DNA markers. *PLoS One* 8(1):, e53448.
- BERDUGO, G. AND J. NARVAEZ. 2014. Genetic diversity and population structure of bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Prochilodontidae) in the Magdalena River basin and its tributaries, Colombia. *Genet. Mol. Biol.* Vol.37, n.1, pp.37-45.
- BERREBI P., BOISSIN E., FANG F. & CATTANEO-BERREBI G. 2005. Intron polymorphism (EPIC-PCR) reveals phylogeographic structure of *Zacco platypus* in China: A possible target for aquaculture development. *Heredity*, 94: 589–598.
- BIERNE N., LENHERT S., BÉDIER E., BONHOMME F. & MOORE S. 2000. Screening for intron-length polymorphisms in penaeid shrimps using exon-primed introncrossed (EPIC)-PCR. *Mol. Ecol.*, 9: 233-235.
- BORSA P, ARLYZA IS, LAPORTE M, BERREBI P. 2012. Population genetic structure of blue-spotted maskray *Neotrygon kuhlii* and two other Indo-West Pacific stingray species (Myliobatiformes: Dasyatidae), inferred from size-polymorphic intron markers. *J Exp Mar Bio Ecol* 438: 32–40.

- BUITRÓN B. & PEREA A. 1998. Estimación de la fecundidad parcial de la caballa (*Scomber japonicus peruanus*) a inicios de otoño 1998. Crucero BIC Humboldt 9803-05 de Tumbes a Tacna. Inf. Inst. Mar Perú, N° 135: 143-146.
- BROWN W., PRAGER E., WANG A. & WILSON A. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. Journal of Molecular Evolution. Vol 18:4. 225-239.
- BYUN S., FANG Q., ZHOU H. AND HICKFORD J. 2009. An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels. Anal Biochem 385: 174-175.
- CACCONE A, GENTILE G, BURNS CE, SEZZI E, BERGMAN W, RUELLE M, SALTONSTALL K, POWELL JR. 2004 Extreme difference in rate of mitochondrial and nuclear DNA evolution in a large ectotherm, Galapagos tortoises. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2004; 31:794–798.
- CARAMANTÍN H. 2006. Dinámica poblacional de *Scomber japonicus peruanus* (Jordán y Hubb, 1925) (Teleostomi: Scombridae) no litoral peruano, no período de 1990 a 2003. Tesis Doctoral en Ciencias. Universidad de Sao Paulo.
- CARAMANTÍN H., VEGA L. & ÑIQUEN M. 2008. Growth parameters and mortality rate of the *Scomber japonicas peruanus* (Jordán &Hubb, 1925) along the Peruvian coast, South Pacific. Brazilian Journal of Oceanography, 56(3):201-210.
- CARAMANTÍN H., VEGA L. & ÑIQUEN M. 2009. The influence of the 1992-1993 El Niño on the reproductive biology of *Scomber japonicas peruanus* (Jordán &Hubb, 1925). Brazilian Journal of Oceanography, 57(4):263-272.
- CARVAJAL VALLEJOS F.M. 2004. Variabilidad genética del Tucunaré (*Cichla aff. monoculus*) en la Amazonia Boliviana. Master en Ciencias Biologicas y Biomédicas, Institut de Biologie moléculaire et Biotechnologie, IBMB-UMSA, La Paz (Bolivie).

- CARVAJAL-VALLEJOS F., DUPONCHELLE F., BALLIVIAN J., HUBERT N., RODRÍGUEZ J., BERREBI P., CORNEJO S. & RENNO J. 2010. Population genetic structure of *Cichla pleiozona* (Perciformes: Cichlidae) in the Upper Madera basin (Bolivian Amazon): sex-biased dispersal?. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57: 1334–1340.
- CASTILLO-DAVIS CI, MEKHEDOV SL, HARTL DL, KOONIN EV, KONDRASHOV FA. 2002. Selection for short introns in highly expressed genes. *Nat Genet*; 31(4):415–418
- CASTRO J. & SANTANA A. 2000. Synopsis of biological data on the Chub Mackerel (*Scomber japonicus* Houttuyn, 1782). *FAO Fisheries Synopsis* 157: 1-77.
- CASTRO, J. 1991. Ecología trófica de la caballa (*Scomber japonicus* Houttuyn, 1782) en aguas del Archipiélago Canario. Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 313 pp.
- CHARLESWORTH, B., MORGAN, M. T., & CHARLESWORTH, D. 1993. The effect of deleterious mutations on neutral molecular variation. *Genetics*, 134(4), 1289-1303.
- CHARLESWORTH D., AND J. WILLIS. 2009. The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics*, 10, 783–796
- CHAUHAN, T. & RAJIV, K. 2010. Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 1, 281-291.
- CHAVEZ, F.P., RYAN, J., LLUCH-COTA, S.E. AND NIQUEN C., M. 2003. From anchovies to sardines and back: multidecadal change in the Pacific Ocean. *Science* 299: 217-221.
- CHENG, Q., ZHU, Y. & CHEN, X. 2014. High polymorphism and moderate differentiation of chub mackerel, *Scomber japonicus* (Perciformes: Scombridae),

along the coast of China revealed by fifteen novel microsatellite markers. Conservation Genetics Volume 15, Issue 5, pp 1021–1035.

- CHENG, J., YANAGIMOTO, T., SONG, N. & T. GAO. 2015. Population genetic structure of chub mackerel *Scomber japonicus* in the Northwestern Pacific inferred from microsatellite analysis. Mol Biol Rep. 42: 373.
- CHIRICHIGNO F. N. & R. M. CORNEJO. 2001. Catálogo comentado de los peces marinos del Perú. Instituto del Mar del Perú, IMARPE, Publicación especial. Callao, Perú. 314 p.
- CHOW S. 1998. Universal PCR primers for calmodulin gene intron in fish. Fisheries Science, 64: 999-1000.
- CHOW S. & NAKADATE M. 2004. PCR primers for fish G6PD gene intron and characterization of intron length variation in the albacore *Thunnus alalunga*. Molecular Ecology Notes, 4: 391–393.
- CHOW S., YANAGIMOTO T. & NAKAMURA Y. 2015. Universal primers for exon-priming intron-crossing (EPIC) PCR on ribosomal protein genes in marine animals. Int Aquat Res., 7: 245–250.
- CHOW, S. & YANAGIMOTO, T. 2016. Universal PCR primers for ribosomal protein gene introns of fish. International Aquatic Research. 8: 29.
- CHOW S., TAKEYAMA H. 1998. Intron length variation observed in the creatine kinase and ribosomal protein genes of the swordfish. *Xiphias gladius*. Fish. Sci. 64:397–402.
- CHOWDHURY M., RAHMAN M., NAHAR L, RAHMAN M., REZA H., S. AHMED. 2016. Efficiency of Different DNA Extraction Methods for Fish Tissues: A Comparative Analysis. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences. Volume 11, Issue 3 Ver. IV.
- ČIKEŠ KEČ V. & ZORICA B. 2011. Biometry markers of chub mackerel, *Scomber japonicus*, Houttuyn, 1782, in the Adriatic Sea. Acta Adriatica, 52(2): 215 – 222.

- COLLETTE B. & NAUEN C. 1983. FAO Species catalogue. 2. Scombrids of the world. An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos and related species known to date. FAO Fish. Synop. 125 (2): 1-137 pp.
- CORTE-REAL H., DIXON D. & HOLLAND P. 1994. Intron-targeted PCR: a new approach to survey neutral DNA polymorphism in bivalve population. *Marine Biology*, 120: 407–413.
- COYLE T. 1998. Stock identification and fisheries management: the importance of using several methods in a stock identification study. "Taking Stock: defining and Managing Shared Resources" Ed by DA. Hancock, Australian Society for Fishery Biology, Sydney, Australia, pp 173–182.
- CROKER, R. 1933. The California mackerel fishery. *Calif Div. Fish. Game, Fish. Bull.*, 40:1-149.
- DAWSON, W. 1986. La interpretación de las estructuras en otolitos para la estimación de edad y crecimiento de algunos peces pelágicos del Ecuador. *Bol. Cient. Téc. Instituto Nacional de Pesca del Ecuador*. 9 (1): 7-24.
- DEVILLE C. 2016. Variabilidad morfológica y genética del pejerrey *Odontesthes regia* (Humboldt, 1821) y su implicancia en la determinación de stocks. Tesis de pregrado. UNMSM.
- DRAKE J., CHARLESWORTH B., CHARLESWORTH D. & CROW J. 1998. Rates of Spontaneous Mutation. *GENETICS*. Vol. 148 no. 4. 1667-1686.
- EGUIARTE L., SOUZA V. & AGUIRRE X. 2007. Ecología molecular. Instituto Nacional de Ecología, Semarnat.
- ENFEN 2012. N° 01-03, 2012. Comunicado Oficial. COMITÉ MULTISECTORIAL ENCARGADO DEL ESTUDIO NACIONAL DEL FENÓMENO EL NIÑO (ENFEN).

- _____ 2013. N° 01-04, 2013. Comunicado Oficial. COMITÉ MULTISECTORIAL ENCARGADO DEL ESTUDIO NACIONAL DEL FENÓMENO EL NIÑO (ENFEN).
- _____ 2014. N° 01-13, 2014. Comunicado Oficial. COMITÉ MULTISECTORIAL ENCARGADO DEL ESTUDIO NACIONAL DEL FENÓMENO EL NIÑO (ENFEN).
- ESPINOZA P. NAVARRI I. & TORRIANI F. 1998. Variaciones en el espectro alimentario de los principales recursos pelágicos durante otoño 1998. Crucero BIC Humboldt 9803-05 de Tumbes a Tacna. Inf. Inst. Mar Perú 135: 134-142.
- ESTRELLA C. & SWARTZMAN G. 2010. The Peruvian artisanal fishery: Changes in patterns and distribution over time. Fisheries Research, 101: 133-145.
- EXCOFFIER, L. AND H.E. L. LISCHER (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources. 10: 564-567.
- FAO. 2014a. FAO yearbook 2012. Fishery and Aquaculture Statistics. FAO, Rome.
- FAO. 2015. Coping with Climate Change. The roles of genetic resources for food and agricultura. Commission on Genetic Resources for Food and Agricultura. Roma. 110 págs.
- FOX C. AND WOLF J. 2006. Evolutionary Genetics: Concepts and Case Studies. eds. Oxford University Press, New York, 608 pp.
- FRANCE S., TACHINO N., DUDA T., SHLESER R. & PALUMBI S. 1999. Intraspecific Genetic Diversity in the Marine Shrimp *Penaeus vannamei*: Multiple Polymorphic Elongation Factor-1a Loci Revealed by Intron Sequencing. Mar. Biotechnol., 1: 261–268.

- FREELAND J., PETERSEN S., HEATHER KIRK. 2011. Molecular Ecology, 2nd Edition. John Wiley & Sons.
- FUCHS E. & J. HAMRICK. 2010. Genetic Diversity in the Endangered Tropical Tree, *Guaiaicum sanctum* (Zygophyllaceae). Journal of Heredity. 101(3):284–291.
- FUTUYMA D. 2005. Evolution. Sinauer Associates. Sunderland, USA.
- GARCÍA, M. L. 1983. Variabilidad en la distribución y abundancia de huevos y larvas de macarela (*Scomber japonicus peruanus*) y de algunos Clupeidos en aguas ecuatorianas. En: Sharp, G.D. y Shirke (eds). Actas de la Consulta de Expertos para examinar los cambios en la abundancia y composición por especies de recursos de peces neríticos. San José, Costa Rica, 18-29 Abril 1983. FAO. Inf. Pesca N° 291. Vol. 2:151-178.
- GARCIA DE LEON, F.J., CHIKHI, L., BONHOMME, F., 1997. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). Mol. Ecol. 6, 51-62.
- GARNIER-GÉRÉ P. AND L. CHIKHI. 2013. Population Subdivision, Hardy–Weinberg Equilibrium and the Wahlund Effect. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester
- GÉRARD K., E. GUILLOTON, S. ARNAUD-HAOND, D. AURELLE, R. BASTROP, P. CHEVALDONNE. 2013. PCR survey of 50 introns in animals: Cross-amplification of homologous EPIC loci in eight non-bilaterian, protostome and deuterostome phyla, Mar. Genomics. 12. 1–8.
- GOUDET, J. 1995. FSTAT (version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. J. Hered. 86, 485–486.
- GRAUR D. & LI W. 2000. Fundamentals of Molecular Evolution, Second Edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland.

- GUTIERREZ-RODRIGUEZ C. & R. LASKER. 2015. Microsatellite variation reveals high levels of genetic variability and population structure in the gorgonian coral *Pseudopterogorgia elisabethae* across the Bahamas. *Mol Ecol.* 2005 Nov; 14(13):4205-6.
- GUTIERREZ, M. G. SWARTZMAN, A. BERTRAND Y S. BERTRAND. 2007. Anchovy (*Engraulis ringens*) and sardine (*Sardinops sagax*) spatial dynamics and aggregation patterns in the Humbolt Current ecosystem, Peru, from 1983 – 2003. *Fish. Ocenogr.* 16(2): 155 – 168.
- HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- HARRIS, N. L., & SENAPATHY, P. 1990. Distribution and consensus of branch point signals in eukaryotic genes: a computerized statistical analysis. *Nucleic acids research*, 18(10), 3015-3015.
- HASSAN, M., LEMAIRE C., FAUVELOT C. & BONHOMME F. 2002. 17 New Epic-PCR amplifiable introns in fish. *Mol. Ecol.* 2:334-340.
- HIYAMA Y., YODA M. & OHSHIMO S. 2002 .Stock size fluctuations in chub mackerel (*Scomber japonicus*) in the East China Sea and the Japan/East Sea. *Fisheries Oceanography*, 11(6): 347–353.
- HOAREAU, T. B., BOSC, P., VALADE, P. & BERREBI, P. (2007). Gene flow and genetic structure of *Sicyopterus lagocephalus* in the south-western Indian Ocean, assessed by intron-length polymorphism. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 349, 223–234.
- IFOP. 2007. Estudio Biológico-pesquero de la caballa entre la I-X Regiones. Informe Final. Proyecto FIP N° 2005-19. 417 p.
- IMARPE. 2010. Anuario científico tecnológico. Vol. 10, enero - diciembre 2010.
- _____. 2012. Anuario científico tecnológico. Vol. 12, enero - diciembre 2012.

- _____. 2013. Anuario científico tecnológico. Vol. 13, enero - diciembre 2013.
- _____. 2014. Anuario científico tecnológico. Vol. 14, enero - diciembre 2014.
- _____. 2015. Anuario científico tecnológico. Vol. 15, enero - diciembre 2015.
- IMARPE & PRODUCE. 2009. Prospección Bioceanográfica de los recursos jurel y caballa-2009.
- JENNINGS R. & ETTER R. 2011. Exon-primed, intron-crossing (EPIC) loci for five nuclear genes in deep-sea protobranch bivalves: primer design, PCR protocols and locus utility. *Molecular Ecology Resources*, 11(6): 1102-1112.
- JIANG L., SU Y., WU C., CHEN Y., ZHU Y., ZHANG J. AND C. GU. 2014. Phylogenetic estimation of Sciaenidae in the East China Sea inferred from nuclear EPIC DNA sequence variation. *Biochemical Systematics and Ecology*. Vol 53, April 2014, Pages 69–75
- JORDÁN, R. 1983. Variabilidad de los recursos pelágicos en el Pacífico sudeste. In: Sharp, G.D. & J. Csirke (eds). *Proceedings of the expert consultation to examine changes in abundance and species composition of neritic fish resources*, San Jose, Costa Rica, 18-29April 1983. A preparatory meeting for the FAO World conference of fisheries management and development. FAO. Fish. Rep. 291(2):113-128.
- KALINOWSKI, ST, TAPER, ML & MARSHALL, TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1106.
- Keller L. and D. Waller. 2002. Inbreeding effects in wild populations. Vol17, Issue 5, p230–241.
- KRAMER K. 1969. Synopsis of the biological data on the Pacific mackerel, *Scomber japonicas* Houttuyn (northeast Pacific). Fish Synopsis N°40, p. 1-18.

- LEVIN, S., CARPENTER, S., GODFRAY, H., KINZIG, A., LOREAU, M., LOSOS, J. & MORRIS, C. G. 2009. The Princeton Guide to Ecology. Princeton University Press.
- LI C, RIETHOVEN J. & MA L. 2010. Exon-primed intron-crossing (EPIC) markers for non-model teleost fishes. BMC Evol. Biol., 10:90.
- LIN Y. 1998. Population genetic structure of *Scomber australasicus* and *Scomber japonicus* fisheries resources. Master thesis of Institute of Oceanography, National Taiwan University, 59pp. (In Chinese with English abstract).
- LIU, Z. & CORDES, J. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture, 238, 1-37.
- LOZANO-REY L. 1952. Peces fisoclistos. En: Serie de Ciencias Naturales. Tomo XIV, Memorias de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de Madrid. 613 pp.
- MARTÍNEZ, C., G. BÖHM, L. CABALLERO; E. DÍAZ, A. ARANIS; F. ESPINDOLA, F. CERNA; C. MACHUCA, V. BOCIC; L. MUÑOZ; R. ARAVENA, M. AYALA, H. REYES, C. VERA Y Z.. YOUNG. 2006. Programa: Seguimiento del Estado de Situación de las Principales Pesquerías Nacionales. Proyecto: Investigación de la Situación de la Pesquería Pelágica de la Zona Norte, 2005. Convenio SUBPESCA - IFOP. Inst. Fom. Pesq. Valparaíso, Chile.
- MARTINI G, TONIOLO D. & VULLIAMY T. 1986. Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydrogenase. EMBO Journal, 5: 1849–1855.
- MASON P., STEVENS D. & LUZZATTO L. 1995. Genomic structure and sequence of the *Fugu* *bripes* glucose-6-phosphate dehydrogenase gene (G6PD). Genomics, 26: 587–591.

- MEJÍA J., SAMAMÉ M. & PASTOR A. 1970. Información básica de los principales peces de consumo. Serie de Informes Especiales N° IM-62. Instituto del Mar del Perú.
- MENDO, J. 1984. Edad, crecimiento y algunos aspectos reproductivos y alimentarios de la caballa *Scomber japonicus peruanus*. Bol. Inst. Mar Perú-Callao, 8(4):101 -156.
- MENZ, A. Y S. PIZARRO. 1988. La pesquería, biología y bionómica de la macarela (*Scomber japonicus*, Houttuyn 1782). Bol. Cient. Téc. Instituto Nacional de Pesca del Ecuador. Vol 9(10). 48 p.
- MIÑANO J. & CASTILLO J. 1971. Primeros resultados de la investigación biológico-pesquera de la “caballa” *Scomber japonicus peruanus* J. y H. Serie de Informes Especiales N°IM-84. Instituto del Mar del Perú.
- ÑIQUEN M. &BOUCHON M. 2004. Impact of El Niño of pelagic fisheries in Peruvian waters. Deep-Sea Res., II, v. 51, p. 563-574.
- ÑIQUEN M., M. BOUCHON, D. ULLOA & A. MEDINA. 2013. Análisis de la pesquería del jurel *Trachurus murphyi* en el Perú. En: Csirke J., R. Guevara-Carrasco & M. Espino (Eds.). Ecología, pesquería y conservación del jurel (*Trachurus murphyi*) en el Perú. Rev. peru. biol. número especial 20(1): 097 – 106.
- ORE D. 2011. Estructura genética de la población de merluza peruana (*Merluccius gayi peruanus*) (Primavera, 2011) usando variantes de secuencia de la Región de Control Mitocondrial. Tesis de pregrado. UNMSM.
- Okumus I., Çiftci Y. 2003. Fish population genetics and molecular markers: II- molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. Turk J Fish Aquat Sci 3: 51–79.

- PAJARO, M. 1993. Consideraciones sobre la alimentación de la caballa (*Scomber japonicus*) con especial énfasis en la depredación de huevos y larvas de peces. INIDEP Doc. Cient., 2: 19-29.
- PAREDES F. 2013. Caracterización molecular de las llamas (*Lama glama*) Ch'aku y Ccara del banco de germoplasma de alpacas de color y llamas del centro experimental Illpa-INIA anexo Quimsachata, usando marcadores microsatélites. Tesis para optar el título de biólogo. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- PARRISH, R. & MACCALL A. 1978. Climatic variation and exploitation in the Pacific mackerel fishery. Calif. Dep. Fish Game, Fish Bull., 167; 110 pp.
- PEAKALL, R. AND SMOUSE P.E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. Bioinformatics 28, 2537-2539.
- PEÑA N., ALHEIT J. & NAKAMA M. 1986. Fecundidad parcial de la caballa del Perú (*Scomber japonicus peruanus*). Bol. Inst. Mar Perú: 10(4).
- PÉREZ M. 1997. Marcadores moleculares, variabilidad genética en las poblaciones y evolución. Organización y evolución del genoma eucariota: marcadores moleculares
III Simposio Científico en Biología Celular y Molecular, España. Págs. 247-266.
- PINK, R., WICKS, K., CALEY, D., PUNCH, K., JACOBS, L., & F. CARTER. 2011. Pseudogenes: Pseudo-functional or key regulators in health and disease? RNA, 17(5), 792–798.
- PINK R, CARTER D. 2013. Pseudogenes as regulators of biological function. Essays Biochem. 2013; 54:103–112.
- PRODUCE. 2002. DS N°. 001-2002: Establecen que los recursos sardina, jurel y caballa serán destinados al consumo humano directo. 06 de setiembre 2002. El Peruano. Normas Legales: 229522-229523.

- PRODUCE. 2007. DS N°. 011-2007: Aprueban Reglamento de Ordenamiento Pesquero de Jurel y Caballa. 13 de abril de 2007. El Peruano. Normal Legales: 343399-343402.
- PRODUCE 2013. R.M. N° 363-2013. Establecen límites de captura del recurso Jurel y del recurso Caballa para las actividades extractivas de la flota industrial.
- QU, L., LI, X., WU, G. AND YANG, N. 2005. Efficient and sensitive method of DNA silver staining in polyacrylamide gels. ELECTROPHORESIS, 26: 99–101.
- SANCHES A. 2007. Estrutura genética populacional de *Brycon hilarii* na sub-bacia do Rio Miranda, e seu significado para programas de conservação. Doctoral Thesis, UFSCar, São Carlos, Brazil.
- SANTANDER H. & DE CASTILLO O. 1972. Distribución de huevos y larvas de “Caballa” *Scomber japonicus peruanus* (Jordan y Hubbs) en la costa peruana. Serie de Informes especiales N° IM-103. Instituto del Mar del Perú.
- SERRA, R., O. ROJAS, M. AGUAYO. 1982. Caballa, *Scomber japonicus peruanus*, Jordan y Hubbs. 30 págs. En: Sanhueza, A., C. Martinez, O. Rojas y M. Aguayo (eds.). Estado Actual de las Principales Pesquerías Nacionales. Bases para un Desarrollo Pesquero. CORFO. Gerencia de Desarrollo. IFOP. Santiago, Chile.
- SEVER, T. M., BAYHAN, B., BILECENOGLU, M. AND MAVILI, S. (2006), Diet composition of the juvenile chub mackerel (*Scomber japonicus*) in the Aegean Sea (Izmir Bay, Turkey). Journal of Applied Ichthyology, 22: 145–148.
- SIPOS, R., SZÉKELY, A. J., PALATINSZKY, M., RÉVÉSZ, S., MÁRIALIGETI, K., & NIKOLAUSZ, M. 2007. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. FEMS Microbiology Ecology, 60(2), 341-350.
- SLATKIN, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science 236, 787-792

- SMITH, J. M., & HAIGH, J. 1974. The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genetics Research*, 23(1), 23-35.
- SPIELMAN, D., BARRY B., BRISCOE, D. & R. FRANKHAM. 2004. Does inbreeding and loss of genetic diversity decrease disease resistance? *Conservation Genetics*, 5 (4). pp. 439-448.
- STEPIEN, C. & ROSENBLATT R. 1996. Genetic divergence in antitropical pelagic marine fishes (*Trachurus*, *Merluccius* and *Scomber*) between North and South America. *Copeia*, 1996(3):586-598.
- TANG, X., JI, Y., CHANG, Y., SHEN, Y., TIAN, Z., GONG, W. AND DU, Y. 2016. Population genetic structure and migration patterns of *Liriomyza sativae* in China: moderate subdivision and no Bridgehead effect revealed by microsatellites', *Bulletin of Entomological Research*, 106(1), pp. 114–123.
- TEMPLETON A. 2006. Population genetics and microevolutionary theory. John Wiley & Sons.
- TRIPP M. 2009. Análisis de la estructura genética poblacional del dorado (*Coryphaena hippurus*; linnaeus, 1758) en el noroeste del pacífico mexicano y golfo de california mediante el uso de microsatélites. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del noroeste.
- TSUKAYAMA, I. 1983. Recursos pelágicos y sus pesquerías en Perú. In: Seminario Regional sobre recursos pesqueros y sus pesquerías en el Pacífico Sudeste. *Rev. Corn. Perm. Pac. Sur.*, 13: 25-63.
- TZENG TD & YEH SY. 2007. Morphological variation in the common mackerel (*Scomber japonicus*) off Taiwan. *J. Fish. Soc. Taiwan*, 34(2): 199-207.
- TZENG TD, WANG D, HAUNG HL y YEH SY. 2007. Genetic diversity and population expansion of the common mackerel (*Scomber japonicus*) off Taiwan. *J. Fish. Soc. Taiwan* 34, 281–289

- VASCONCELLOS A., LIMA D., BONHOMME F., VIANNA M. & SOLÉ-CAVA A. 2015 Genetic population structure of the commercially most important demersal fish in the Southwest Atlantic: The white mouth croaker (*Micropogonias furnieri*). Fisheries Research 167: 333–337.
- WAHLUND, S. 1928. Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. Hereditas, 11(1), 65-106.
- WANG, S., HARD, J.J. & UTTER, F. 2002. Salmonid inbreeding: a review. Reviews in Fish Biology and Fisheries. Volume 11, Issue 4, pp 301–319
- WATANABE T. 1970. Morphology and ecology of early stages of life in Japanese common mackerel, *Scomber japonicas* Houttuyn, with special reference to fluctuation of population. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab., 62, 1-283.
- YALÇINKAYA B., YUMBUL E., MOZIOGLU E., M. AKGOZ. 2016. Comparison of DNA extraction methods for meat analysis. Food Chemistry. (In press)
- YAO X, LIU L, YAN M, LI D, ZHONG C, HUANG H (2015) Exon primed intron-crossing (EPIC) markers reveal natural hybridization and introgression in Actinidia (Actinidiaceae) with sympatric distribution. Biochem Syst Ecol 59:246–255
- ZARDOYA R, CASTILHO R, GRANDE C, FAVRE-KREY L, CAETANO S, MARCATO S, KREY G, PATARNELLO T. 2004. Differential population structuring of two closely related fish species, the mackerel (*Scomber scombrus*) and the chub mackerel (*Scomber japonicus*), in the Mediterranean Sea. Mol Ecol 13:1785–1798.
- Zeng, L., Cheng, Q., & Chen, X. 2012. Microsatellite analysis reveals the population structure and migration patterns of *Scomber japonicus* (Scombridae) with continuous distribution in the East and South China Seas. Biochemical systematics and ecology, 42, 83-93.

- ZHU Y., CHENG Q., & S. ROGERS. 2014. Genetic structure of *Scomber japonicus* (Perciformes: Scombridae) along the coast of China revealed by complete mitochondrial cytochrome b sequences. Mitochondrial DNA A, DNA Mapp Seq Anal. Nov; 27 (6):3828-3836.
- ZUZUNAGA, J. 2013. Medidas de conservación y ordenación pesquera del jurel *Trachurus murphyi* en el Perú. Revista Peruana de Biología, [S.l.], v. 20, n. 1, p. 107-113, oct. 2013

10 ANEXO

Anexo 1. Valores promedio de concentración de ADN (ng/ul), relación A260/280 y absorbancia a 260nm.											
Muestra	Promedio			Muestra	Promedio			Muestra	Promedio		
	ADN(ng/ul)	A260/2680	A260		ADN(ng/ul)	A260/2680	A260		ADN(ng/ul)	A260/2680	A260
1L	283.5	1.98	5.67	1V	401.6	1.8	8.03	1P	244.3	1.77	4.88
2L	216.4	1.83	4.34	2V	456.2	1.94	9.12	2P	231.9	1.9	4.64
3L	118.1	1.94	2.36	3V	250.1	1.87	4.05	3P	92.4	1.87	1.85
4L	1108.5	1.97	22.17	4V	276.7	1.36	5.48	4P	204	1.9	4.08
5L	162.4	1.9	3.25	5V	487.9	1.78	9.76	5P	98.1	1.8	1.96
6L	107.7	1.89	3.75	6V	522.4	1.85	10.45	6P	148.8	1.92	2.98
7L	248.4	1.91	4.97	7V	396	1.87	7.92	7P	214	1.9	4.28
8L	100.4	1.7	2.01	8V	593.5	1.76	11.88	8P	559.9	1.7	11.2
9L	126.6	1.82	2.53	9V	90.1	1.96	1.8	9P	515.2	1.96	10.3
10L	85	1.98	1.7	10V	306.7	1.83	6.14	10P	284.4	1.97	5.69
11L	77.9	1.72	1.56	11V	161.4	1.84	3.23	11P	302.4	1.86	6.05
12L	109.1	1.94	2.18	12V	645.2	1.78	12.9	12P	348.6	1.64	6.97
13L	417.2	1.84	8.34	13V	202.4	1.9	4.05	13P	308.7	1.92	6.17
14L	758.1	2.04	15.16	14V	279.2	1.99	5.58	14P	242.5	1.95	4.85
15L	445.6	1.97	8.89	15V	226.6	2	4.53	15P	141.2	1.9	2.82
16	594.7	1.89	11.89	16V	249	1.95	4.98	16P	134.9	1.67	2.7
17L	340.4	1.86	6.81	17V	252.9	2.03	5.06	17P	127.7	1.93	2.55
18L	131.7	1.87	2.63	18V	289.3	1.86	5.78	18P	340.5	1.97	6.81
19L	301.1	1.94	6.02	19V	238.1	1.95	4.76	19P	227	1.97	4.54
20L	552.7	1.96	11.05	20V	466.1	1.83	9.32	20P	276.5	1.76	5.53
21L	132.1	1.92	2.64	21V	234.3	1.95	4.69	21P	420.2	2.02	8.4
22L	107	1.8	2.14	22V	635	1.85	12.7	22P	451.3	1.83	9.03
23L	48.6	1.87	0.97	23V	456.2	1.78	9.12	23P	189.4	2.01	3.79
24L	129.6	1.85	2.59	24V	122.2	1.93	2.44	24P	519.6	1.94	10.39
25L	283.4	1.8	5.67	25V	426.9	1.91	8.54	25P	169.1	2	3.38